

HOVEDOPPGAVE  
LEGEMIDDELANALYSE  
FOR GRADEN CAND. PHARM.

**Virkningene av  
luteiniserende og  
gonadotropinfrigjørende hormoner  
på biomarkører i blod og urin**

**Michelle K. Crocker Lindøe**



AVDELING FOR LEGEMIDDELANALYSE  
FARMASØYTISK INSTITUTT

DET MATEMATISK-  
NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

UNIVERSITET I OSLO  
HØSTEN 2007

Hovedoppgave i legemiddelanalyse  
Farmasøytisk Institutt  
Universitetet i Oslo

# **Virkningene av luteiniserende og gonadotropinfrigjørende hormoner på biomarkører i blod og urin**

Michelle K. Crocker Lindøe

## **Veiledere:**

Prof. Dr. Peter Hemmersbach  
Farmasøytisk Institutt/  
Seksjon for doping analyse, Hormonlaboratoriet,  
Aker Universitetssykehus

Cand.Scient. Ingunn Hullstein  
Seksjon for doping analyse, Hormonlaboratoriet,  
Aker Universitetssykehus

## **Oppgaven ble utført ved:**

Seksjon for doping analyse, Hormonlaboratoriet,  
Aker Universitetssykehus

## FORORD

Med dette vil jeg rette en stor takk til alle ansatte ved Seksjon for dopinganalyse på Aker Universitetssykehus. Dere har alle vært hjelpsomme og imøtekommende. Tusen takk for all hygge og lærdom dere har gitt meg.

Jeg vil gjerne få takke mine veiledere Ingunn Hullstein og Peter Hemmersbach. En spesiell takk går til Ingunn som i turbofart satt seg inn i oppgaven og dens problemstillinger da min opprinnelige veileder Hanne S. Lund gikk ut i permisjon. Ingunn har vært strålende og har alltid tatt seg tid til å svare på spørsmål underveis. Tusen takk for din innsats mot slutten, uten deg ville jeg nok ikke klart det. Jeg har satt utrolig stor pris på din tilstedeværelse.

Tusen takk også til John Henninge som har viet tid til meg og min oppgave selv om han ikke var min veileder.

En stor takk går også til Hanne S. Lund som veiledet meg på en god måte gjennom perioden med rekruttering av forsøkspersoner og gjennomføringen av utskillelsesforsøket.

Ingvild Liborg, min medstudent, fortjener også en takk. Mange samtaler både faglige og mindre faglige, har funnet sted på vårt felles kontor. Du har vært en viktig del av hverdagen.

Jeg vil også benytte anledningen til å takke Anti Doping Norge for støtte til prosjektet. Tusen takk til alle forsøkspersonene som bidro med urin.

Tusen tusen takk til venner og familie, dere har hatt tro på meg og gitt meg oppmuntring, skryt og gode råd gjennom hele studietiden. Dere får meg til å føle meg flink.

Peder, min kjære samboer fortjener også en STOR takk. Du har vært utrolig tålmodig og støttende. Det har vært en travel tid for meg både med ”Skal Vi Danse?”, RHYTHM og hovedfaget. Du har latt meg få styre med mitt og stått med middagen klar mang en gang. Takk for at du har latt meg få lov til å oppleve alt dette. Gleder meg til å reise på hyttetur med deg når Cand. Pharm. studiet er gjennomført om en knapp uke. ☺.

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>7</b>
<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INNLEDNING .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Doping generelt.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Steroider.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Biosyntese av steroider.....	14
1.2.2 De ulike stoffene i studien .....	16
<b>1.3 Gonadotropinfrisettende hormoner.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Gonadotropiner .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 LH.....	21
1.4.2 FSH .....	21
<b>1.5 Bruk/misbruk av GnRH og LH.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6 Legemidlene i denne studien .....</b>	<b>23</b>
1.6.1 Luveris (Serono).....	23
1.6.2 Suprecur (Aventis Pharma).....	23
1.6.3 Synarela (Pfizer).....	24
<b>1.7 Metabolisme.....</b>	<b>24</b>
1.7.1 Fase 1-metabolisme .....	25
1.7.2 Fase 2-metabolisme .....	26
1.7.3 Metabolisme av LH, FSH, GnRH og SHBG .....	27
<b>1.8 Analyse av endogene analytter .....</b>	<b>28</b>
1.8.1 Intern standard.....	29
1.8.2 Fast-fase-ekstraksjon.....	31
1.8.3 Væske-væske-ekstraksjon.....	33
1.8.4 Hydrolyse.....	33
1.8.5 Derivatisering .....	34
1.8.6 Gasskromatografi.....	35
1.8.7 Massespektroskopi.....	35
<b>1.9 Metoder brukt ved hormonlaboratoriets rutineseksjon .....</b>	<b>37</b>
<b>1.10 Problemstilling.....</b>	<b>40</b>
<b>2 EKSPERIMENTELT .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Forsøkspersoner .....</b>	<b>41</b>



<b>2.2</b>	<b>Organisering av forsøket.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3</b>	<b>Legemidler, kjemikalier og utstyr .....</b>	<b>42</b>
<b>2.4</b>	<b>Løsninger.....</b>	<b>45</b>
2.4.1	Løsninger til bruk i prøveopparbeidelsen .....	45
2.4.2	Derivatiseringsløsninger.....	45
2.4.3	Tillaging av intern standard til kvantifisering .....	46
2.4.4	Kalibratorløsninger .....	46
<b>2.5</b>	<b>Metodeutvikling.....</b>	<b>48</b>
2.5.1	Forarbeid.....	48
2.5.2	Prøveopparbeidelsen .....	49
<b>2.6</b>	<b>Analyseparametre .....</b>	<b>51</b>
2.6.1	GC-Parametre.....	51
2.6.2	MS-opptaksparametre .....	51
<b>2.7</b>	<b>Identifisering og kvantifisering.....</b>	<b>52</b>
<b>2.8</b>	<b>Validering.....</b>	<b>54</b>
2.8.1	Presisjon .....	55
2.8.2	Nøyaktighet.....	56
2.8.3	Deteksjonsgrense (LOD) .....	57
2.8.4	Kvantifiseringsgrense (LOQ).....	58
2.8.5	Spesifisitet.....	58
2.8.6	Linearitet.....	59
2.8.7	Robusthet.....	59
2.8.8	Systemets egnethet.....	59
2.8.9	Gjenvinning.....	60
<b>3</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Validering.....</b>	<b>61</b>
3.1.1	Presisjon og nøyaktighet.....	61
3.1.2	LOD og LOQ .....	63
3.1.3	Linearitet.....	63
3.1.4	Gjenvinning.....	64
<b>3.2</b>	<b>Fremstilling av resultatene fra prøvene .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3</b>	<b>Blodprøver.....</b>	<b>66</b>
3.3.1	Luveris.....	66
3.3.2	Suprecur.....	68
3.3.3	Synarela .....	70
<b>3.4</b>	<b>Urinprøvene .....</b>	<b>72</b>
3.4.1	LH målt ved immunoassay .....	73
3.4.2	Testosteron.....	74
3.4.3	Epitestosteron .....	75

3.4.4	Androsteron.....	76
3.4.5	Etiokolanolon .....	77
3.4.6	DHEA.....	78
3.4.7	6 $\beta$ -OH-androsteron .....	79
3.4.8	6 $\beta$ -OH-etikolanolon .....	80
3.4.9	11 $\beta$ -OH-androsteron .....	81
3.4.10	11 $\beta$ -OH-etikolanolon .....	82
3.4.11	5 $\alpha$ -androstandiol .....	83
3.4.12	5 $\beta$ -androstandiol .....	84
3.4.13	Pregnantriol.....	85
3.4.14	Østron .....	86
<b>4</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Validering.....</b>	<b>87</b>
4.1.1	Presisjon og nøyaktighet.....	87
4.1.2	LOD og LOQ .....	88
4.1.3	Linearitet.....	89
4.1.4	Gjenvinning.....	90
4.1.5	Forsøket .....	91
4.1.6	Blodprøvene.....	92
4.1.7	Urinprøver.....	95
<b>5</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERANSER .....</b>	<b>102</b>

## FORKORTELSER

AAS	anabol-androgene steroider
C <sub>korrigert</sub>	Konsentrasjon korrigert for spesifikk vekt
C <sub>ukorrigert</sub>	Konsentrasjon ikke korrigert for spesifikk vekt
CV	Relativt standardavvik
cAMP	Syklisk Adenosin Monofosfat (cyclic Adenosine Monophosphate)
D	Deuterium
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dehydrotestosteron
EI	Elektronionisasjon (Electron Ionisation)
FSH	Follikkelstimulerende hormon
FSHR	FSH-reseptor
GC	Gasskromatografi
GnRH	Gonadotropinfrisettende hormon (Gonadotropine-releasing hormone)
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
hCG	Human Choriongonadotropin
IOC	International Olympic Committee
IRMS	Isotop Ratio Mass Spectrometry (Isotop ratio massespektroskopi)
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IQR	Interkvartilt område (Inter Quartile Range)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IS	Intern standard
LH	Luteniserende hormon (lutinizating hormone)
LOD	Deteksjonsgrense (Limit of detection)
LOQ	Kvantifiseringsgrense (Limit of quantification)
<i>m/z</i>	masse/ladning
mg	milligram
ml	milliliter
MS	Massespektrometri
MSTFA	N-metyl-N-trimetylsilyltriflouracetamid
ng	nanogram
RIA	Radio Immuno Assay

RT	Retensjonstid
SD	Standard avvik (Standard deviation)
SHBG	Seksualhormonbindende globulin (Sex hormone-binding globulin)
SIM	Selektiv ione monitorering (Selective Ion Monitoring)
T/E	Testosteron/Epitestosteron
TBME	<i>tert</i> -butylmetyleter
TMS	Trimetylsilyl
WADA	World Anti-Doping Agency
μl	mikroliter

## SAMMENDRAG

Studien omfatter et gonadotropin (LH) og to gonadotropinfrisettende hormoner (GnRH) i form av tre legemidler; Synarela, Suprecur og Luveris. Både gonadotropiner og GnRH foreligger som genteknologisk fremstilte preparater og er forbudt å bruke for menn i henhold til WADAs internasjonale dopingliste. Studien skal undersøke hvilke analyseparametre i urin og blod som er egnet til å vurdere inntak av gonadotropiner eller gonadotropinfrisettende hormoner.

En eksisterende analysemetode ved Seksjon for dopinganalyse ble videreutviklet og validert i henhold til retningslinjer gitt ved GTFCh (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie). Videreutviklingen bestod i å legge til deutererte intern standarder, der dette var mulig, for å kunne utføre en kvantitativ analyse.

Både væske-væske og fast-fase ekstraksjon ble benyttet som opprenselsestrinn og til analyse av prøvene ble GC-MS benyttet. LH, FSH, SHBG, østradiol og testosteron ble målt i blodprøvene. I tillegg ble konsentrasjonen av ulike steroider i urin, korrigert for spesifikk vekt, beregnet for alle forsøkspersonene.

Oppgaven ble utført ved Hormonlaboratoriet, Seksjon for dopinganalyse ved Aker Universitetssykehus. Forsøkspersonene, 30 menn mellom 19 og 37 år, ble rekruttert blant farmasi-, medisin-, og vetrinærstudenter, samt andre bekjente. Det ble avgitt urinspotprøver før oppstart og et uskillelsesforsøk over en 24 timers periode ble gjennomført. Blodprøver ble tatt før og 24 timer etter administrering av legemiddelet.

Ved analyse av blodprøvene så vi signifikante endringer av testosteron, LH og østradiol for de forsøkspersonene som fikk GnRH-analoger. Ved analyse av urinprøvene var det få eller ingen endringer å spore. De forskjellene som sees er ikke signifikante og kan like gjerne skyldes tilfeldigheter som administrering av LH eller GnRH-analoger. Et unntak er LH i urin, der det er tydelig forskjell mellom inntak av LH og GnRH-analoger.

# 1 INNLEDNING

## 1.1 Doping generelt

Bruk av stimulerende midler for å øke den fysiske presentasjonsevne er intet produkt av vår tid. Fortellinger om idrettsheltene i det gamle Hellas kan tyde på at stimulerende stoffer, utvunnet av planter, ble brukt for å yte mer. Grunnbegrepene i den internasjonale olympiske bevegelsen – raskere, høyere, sterkere – har nok vært et mål for presentasjonshungrige mennesker i årtusener. Bruk av dopingmidler i organiserte former, har vi få holdepunkter for før i 1960-årene. [1]

Ordet dop stammer opprinnelig fra Sør-Afrika, og er navnet på en plantedrikk som ble laget for å øke psykisk og fysisk utholdenhet. Det er kjent at kinesiske idrettsmenn allerede for 5000 år siden brukte ”Ma Huang”. Den aktive substansen i ”Ma Huang” kom fra planten efedra, og substansen er i dag kjent som efedrin og er et av de forbudte stoffene på dopinglisten. [2,3]

Den moderne idretten vokste frem på midten av 1800-tallet. Og allerede i 1865 meldes det at nederlandske kanalsvømmere benyttet dopingmidler. Sykling var den gang også en av de store idrettene og bruk av stimulerende stoffer var kjent, de franske syklistene brukte koffein, mens belgierne hadde fremstilt en blanding av sukker oppløst i eter. Britiske utøvere inhalerte ren oksygen og tok blandinger av stryknin, heroin og kokain som de skyllet ned med brandy. Det første kjente doping-dødsfallet kom allerede i 1886, da en engelsk syklist døde i et ritt. [4]

To tragiske begivenheter på 1960-tallet bidro sterkt til at idretten startet kampen mot dopingbruk. Under de olympiske leker i Roma 1960 døde den danske toppsyklisten Knud Enemark-Jensen etter en blanding av nicotinal alkohol og amfetamin. I 1967 døde den engelske syklisten Tommy Simpson under en av fjelletappene i Tour de France, også på grunn av amfetaminbruk. Den sistnevnte ulykken ble overført direkte på TV og samme året oppnevnte den internasjonale olympiske komité (IOC) en medisinsk komité som fikk ansvaret for å organisere idrettens dopingarbeid. Systematisk dopingtesting (stimulerende midler) ble gjennomført for første gang ved de olympiske leker i München i 1972. [3,4]

Bruken av androgene-anabole steroider (AAS) fikk sitt gjennombrudd på 1950-tallet. Testosteron ble isolert alt i 1927 og syntetisert i 1935. Vektløftere fra Sovjet begynte med

testosteronbruk tidlig på 1950-tallet. Som svar på dette utviklet USA hormonpreparatet Dianabol (metandienon), som var det første av de store ASS-preparatene innen idretten. Målet var å utvikle et stoff som hadde testosteronets anabole effekter, men ikke de mange bivirkningene. [2,4]

Fra tidlig i 1970-årene og frem til berlinmurens fall i 1989 var DDR regelmessig blant de største medaljevinnerne i internasjonale sportskonkurranser. Dette imponerte og forundret en hel verden. Men etter murens fall kom den uhyggelige sannheten fram. I arkivene til Staatssicherheitsdienst (Stasi) fant man dokumenter som viste at det i DDR var drevet statskontrollert doping av flere tusen utøvere av begge kjønn helt ned til 13 års alder. Det østtyske dopinglaboratoriet ble ikke brukt for å avsløre doping, men til å kontrollere at østtyske utøvere ikke risikerte å bli tatt i dopingkontroll i utlandet. De kvinnelige utøverne som ble sterkest maskulinisert fikk ikke lov til å konkurrere utenfor DDR og i noen tilfeller ble de ekskludert fra landslaget, siden de likevel ikke representere sitt fedreland. [2,4]

I den vestlige verden har det også foregått organisert dopingbruk i stort omfang, men dette har vært organisert i klubber og treningsgrupper ledet av trenere og leger tilknyttet ulike laboratorier. Et hett eksempel er Marion Jones som nylig innrømmet doping, etter at det ble kjent at hun hadde brukt designer-dopet Tetrahydrogestrinon (THG) før OL i Sydney i 2000. THG ble produsert av det farmasøytiske laboratorium Bay Area Laboratory Co-operative, BALCO i USA og ble utviklet spesielt for at det ikke skulle være mulig å oppdage bruk av stoffet med tidens dopingkontroller.

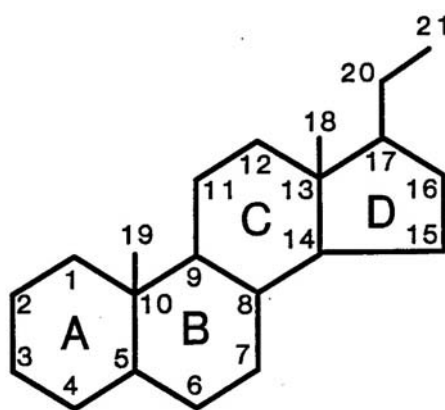
I dag er det World Anti-Doping Agency (WADA) som definerer hvilke stoffer og metoder som omfattes av anti-dopingregelverket og WADA gir hvert år ut en liste med de forbudte stoffene og metodene. De forbudte metodene omfatter blant annet blodoverføring og manipulasjon av prøver under en dopingkontroll, for eksempel urinsubstitusjon. Det er også brudd på dopingbestemmelsene å ikke avgi prøve når dette blir krevd. Det betyr at utøveren til enhver tid skal oppgi hvor de befinner seg, slik at det kan gjennomføres uanmeldte kontroller utenfor konkurranse. [5,6]

Laboratorier som utfører med dopinganalyser skal hvert år akkrediteres. Akkreditering er en offisiell anerkjennelse av at en organisasjon arbeider i henhold til et dokumentert kvalitetssystem og har demonstrert kompetanse til å utføre nærmere beskrevne oppgaver. I

denne sammenheng vil det si at dopinglaboratoriene må kunne dokumentere at deres analysemetoder er egnet til oppgavene og validert i samsvar med internasjonale retningslinjer. Seksjon for dopinganalyse ved Aker Universitetssykehus åpnet i 1984 og ble første gang akkreditert i 1988. I de påfølgende årene fram til i dag har WADA reakkreditert laboratoriet en gang i året. Norsk akkreditering vurderer også laboratoriet med jevne mellomrom. [7]

## 1.2 Steroider

Steroider har et karakteristisk karbonskjelett med syklopentafenantren struktur, eller er stoffer som kan avledes fra denne strukturen. Kolesterol er felles forstadium i syntesen av alle steroidhormonene. Tre 6-kantede ringer (A, B, C) danner fenantrenkjernen, som er bundet sammen med en syklopentanring (D). Ulike steroider varierer i de funksjonelle gruppene som er festet til disse ringene. Stoffklassen inkluderer stoffer som steroler, (f. eks. kolesterol), gallesyrer, kjønnshormoner (f.eks. androgener og østrogener), vitamin D og kortikosteroider. [8]

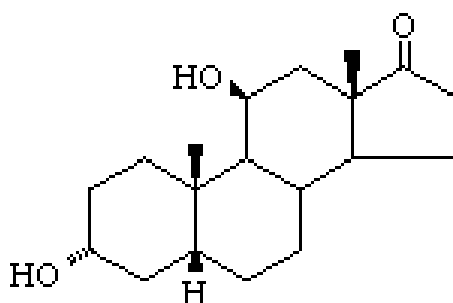


Figur 1 - Nummerert steroidskjelett [9]

Ringene tegnes gjerne plant med papiert, og grupper eller atomer som går inn i planet tegnes med stiplet linje og betegnes som  $\alpha$  (alfa). Grupper som går ut av planet tegnes med kiler eller som heltrukne linjer og betegnes som  $\beta$  (beta). I noen tilfeller kan gruppen inneha begge posisjoner, eller det kan være uklart hvilken posisjon gruppen står i, i slike tilfeller vil bindingen bli tegnet som en sikksakk-strek. Der en binding står alene uten atom i enden indikerer det en  $\text{CH}_3$ -gruppe. Navngivingen er definert av International Union og Pure and Applied Chemistry (IUPAC) og skal gjelde internasjonalt, men dette følges ikke alltid i praksis. Mange steroider har trivialnavn som benyttes i stedet. [8,9]



Dersom steroidet inneholder en eller flere dobbeltbindinger blir dette angitt i navnet. Hvis endingen i gruppenavnet er *-en*, f.eks. i androstendiol, indikerer det at det er en dobbeltbinding i steroidskjelettet. Dersom endingen er *-an* betyr det at steroidskjelettet er uten dobbeltbinding(er). Hvor eventuelle dobbeltbindinger og grupper befinner seg i strukturen, angis med nummeret til karbonatomet som bindingen eller gruppen går ut ifra. *3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -hydroksy-5 $\beta$ -androstan-17-on* (se Figur 2) har to hydroksyl grupper, en ved C-3 som går inn i planet ( $\alpha$ ), og en ved C-11 som går ut av planet ( $\beta$ ), et hydrogen som går ut av planet ( $\beta$ ) i posisjon C-5, og en oksogruppe i C-17 posisjon. Trivialnavnet til denne forbindelsen er 11 $\beta$ -OH-Etiokolanolon.



Figur 2 - 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -hydroksy-5 $\beta$ -androstan-17-on [10]  
(11 $\beta$ -OH-Etiokolanolon)

Steroidene klassifiseres også ofte etter antall karbonatomer som inngår i strukturen, som igjen gjenspeiler strukturelle forskjeller og hvilket stoff de er derivater av; estran C<sub>18</sub> (østrogener), androstaner C<sub>19</sub> (androgener) og pregnan C<sub>21</sub> (kortikosteroider og progesteroner). [8,9]

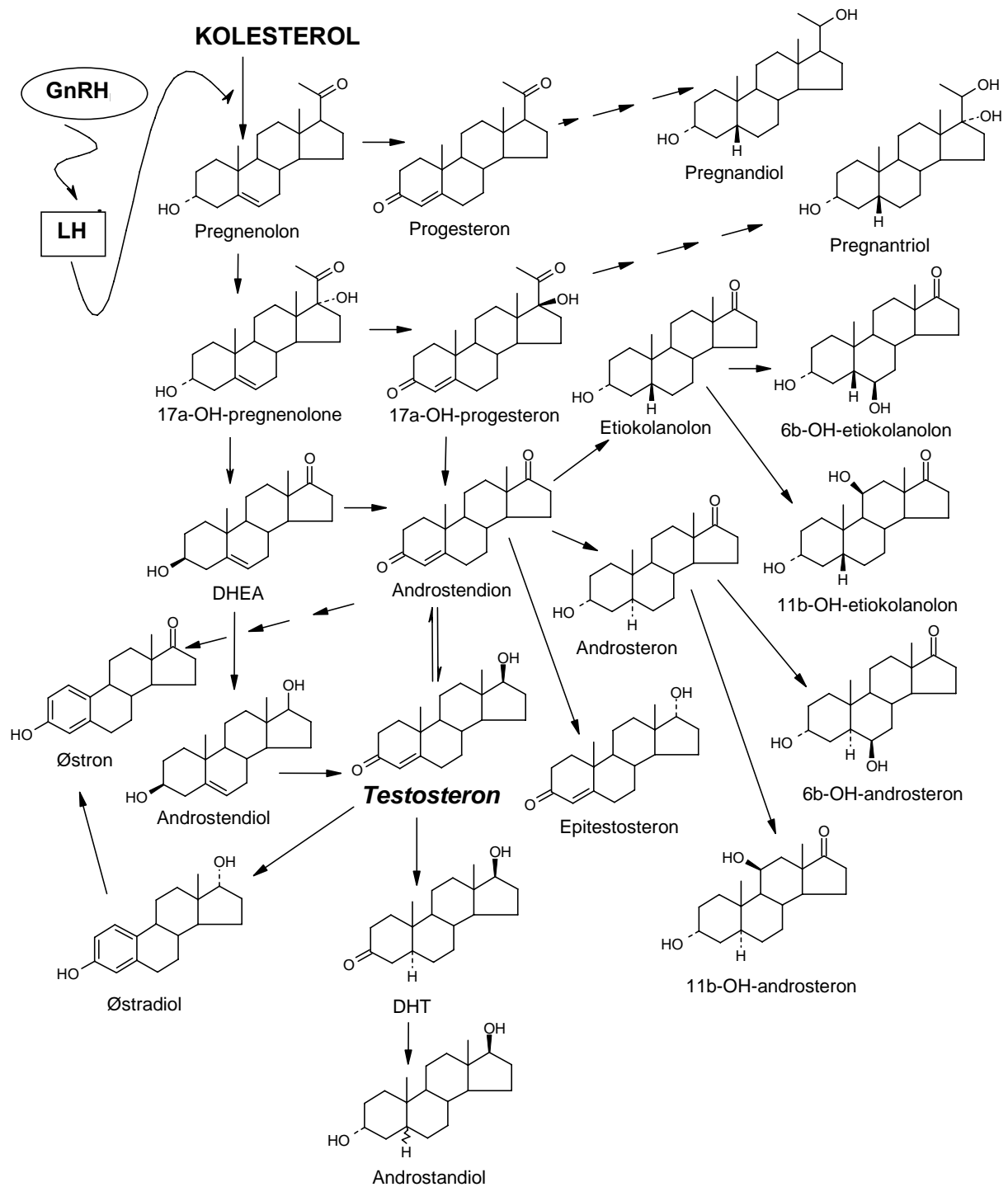
I blodet fraktes steroidhormonene bundet til spesifikke bærerproteiner som for eksempel SHBG, seksualhormonbindende globulin. Videre omdanning og katabolisme skjer i leveren, andre perifere vev og i målorganet.

Steroider er lipidløselige og diffunderer derfor relativt fritt fra blodet gjennom cellemembranen til cytoplasma i målcellene. Her binder steroidhormoner seg til spesifikke reseptorer og danner funksjonelle DNA-bindende enheter som kan trenge inn i cellekjernen. I kjernen binder enhetene seg til spesifikke DNA-sekvenser og induserer transkripsjon av målgenene. [8,9]

### **1.2.1 Biosyntese av steroider**

Hos både menn og kvinner blir endogene steroider syntetisert fra kolesterol i gonadene og i binyrebarken. Mange av enzymene som inngår i syntetiseringen hører til cytokrom P-450-klassen og flere av dem er assosiert i enzymkomplekser. Aktiviteten i forskjellige enzymsystemer kan variere fra person til person. Hvilke og hvor mye steroidhormoner som uttrykkes varierer derfor for hvert individ og er avhengig av arv. Andre faktorer som spiller inn på utskillelsen er blant annet alder og kjønn. [8,9]

Biosyntesen for steroidene i denne studien, samt en enkel sammenheng mellom GnRH, LH og steroidene er vist i Figur 3.



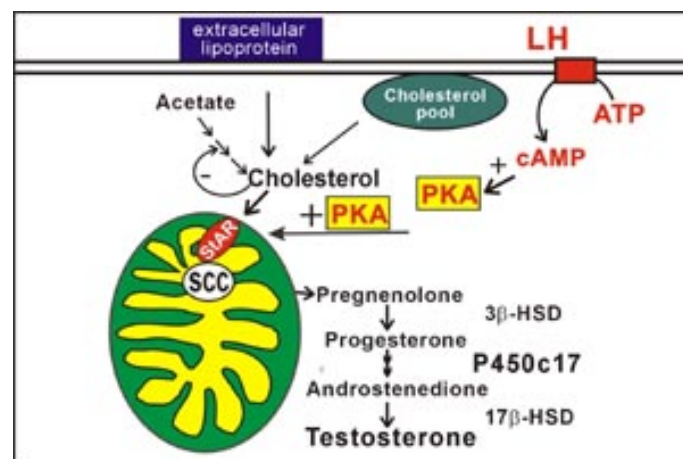
Figur 3 - Biosyntese av steroidhormoner, med inntegnet virkested for GnRH og LH

### 1.2.2 De ulike stoffene i studien

#### Testosteron (17 $\beta$ -hydroksyandrost-4-en-3-on) [10]

Testosteron er det dominerende androgenet hos menn. Testosteron er nødvendig for at de normale mannlige trekkene skal utvikles og opprettholdes. Produksjonen av testosteron øker gjennom puberteten og stimulerer til vekst og utvikling av kjønnsorganer, behåring og øvrig vev.

Hos menn foregår produksjonen hovedsakelig i leydigcellene i testiklene og blir regulert av luteniserende hormon (LH). LH skilles ut fra hypofysen og stimulerer testosteronsyntesen ved å binde seg til overflatereseptorer på leydigcellene. Bindingen fører til en aktivering av en syklisk adenosin monofosfat (cAMP)-mediert mekanisme som øker omdanningen av kolesterol videre til pregnenolon. Figur 4 viser en skjematisk fremstilling.



Figur 4 - LH regulerer syntese av testosteron [11]

Sekresjonen av testosteron foregår pulserende, i takt med LH sekresjonen, og det syntetiseres 5 til 7 mg testosteron per døgn. Hos normale unge menn, finner vi den høyeste konsentrasjon rundt kl 08:00 og den laveste rundt kl 20:00.

På cellulært nivå kan testosteron utgjøre sin effekt gjennom tre ulike hormoner; testosteron i seg selv og via to metabolitter, dihydrotestosteron (DHT) og østradiol. Både testosteron og DHT virker ved å binde seg til androgenreseptorer, som kodes av et gen som sitter på X-kromosomet. Selv om det kun finnes en type androgenreseptor fører forskjellige kofaktorer og koenzymer til at testosteron kan ha forskjellig effekt i de ulike vevstyper.

I vev som uttrykker enzymer  $5\alpha$ -reductase blir testosteron omdannet til DHT i målcellens cytoplasma. Enzymet aromatase omdanner testosteron til østradiol. For mer informasjon vedrørende DHT og østradiol, se under. [12,13]

Testosteron sirkulerer i blodet og 44-65 % er bundet til seksualhormonbindende globulin (SHBG). I serum er det likevekt mellom den proteinbundne fraksjonen og den frie fraksjonen, hvor det er den sistnevnte som har biologisk effekt. Ratio testosteron/SHBG vil gjenspeile den frie konsentrasjonen og blir i noen tilfeller brukt som et bedre mål for androgenpåvirkningen enn den totale testosteronkonsentrasjonen. [9]

### **Epitestosteron ( $17\alpha$ -hydroksyandrost-4-en-3-on) [10]**

Epitestosteron er  $17\alpha$ -isomeren til testosteron og er et endogent steroid som utskilles i samme konsentrasjonsområde som testosteron. Epitestosteron er ikke en metabolitt av testosteron, men er antakelig en metabolitt av androstendion. Hos menn produseres halvparten av den totale mengde epitestosteron i gonadene, mens de resterende 50 % er det fortsatt noe usikkerhet om. [14]

Epitestosteron har ingen eller svært liten androgen effekt i seg selv, men er likevel interessant i doping sammenheng. Ved dopingkontroll er forholdet mellom testosteron og epitestosteron (T/E-ratio) i urin en indirekte markør på testosteron administrering. Epitestosteron kan derfor brukes som et maskeringsmiddel, for å skjule bruk av testosteron. Dette kan gjøres ved å innta testosteron og epitestosteron sammen, i et forhold som gjør at T/E-ratioen forblir under grensen 4:1, som er det WADA tillater. Økt T/E ratio kan også være en indikasjon på administrasjon av androstendion og DHEA. [15,17]

Epitestosteron er ikke tilgjengelig som et farmasøytisk produkt, men kan likevel skaffes via den kjemiske industrien. Epitestosteron er klassifisert som et urin-manipulerende stoff og det kreves at laboratorier rapporterer tilfeller der konsentrasjon av epitestosteron er over 200 ng/ml. [16,17]

### **Dihydrotestosteron ( $17\beta$ -hydroksy- $5\alpha$ -androstan-3-on) [10]**

Dihydrotestosteron (DHT) er en biologisk aktiv metabolitt av testosteron. Enzymet  $5\alpha$ -reduktase katalyserer omdannelsen av testosteron til det mer potente androgenet DHT ved å redusere dobbelbindingen mellom C4 og C5. DHT er mer potent fordi steroidet har større

affinitet til de androgene reseptorene enn testosteron. DHT-reseptor komplekset bindes til DNA i cellekjernen og stimulerer til mRNA- og proteinsyntese. DHT ser ut til å påvirke utviklingen av penis, økt vekst av penis og behåring under puberteten. [12,13,18]

Bruken av DHT i dopingsammenheng har vært begrenset, da det ikke ser ut til at stoffet innehar noen særlig anabol effekt. [19].

### **Dehydroepiandrosteron (3 $\beta$ -hydroksyandrost-5-en-17-on) [10]**

Dehydroepiandrosteron (DHEA) er kvantitativt sett, det dominerende androgen i binyrebarken hvor det syntetiseres fra kolesterol. DHEA produseres også i mindre mengder i gonadene, i fettvev og i hjernen. DHEA er en forløper til testosteron og DHT.

Økte nivåer av DHEA, vil kunne føre til økt produksjon av testosteron. DHEA har i seg selv en svak androgen effekt, og bare en minimal mengde (ca. 1 %) blir omdannet til testosteron

Siden DHEA er en 3 $\beta$ -OH forbindelse, blir den hovedsaklig sulfatert (punkt 1.7.2). I denne studien analyserer vi glukuronidfraksjonen av DHEA, og ikke den sulfaterte, og det sees svært lave verdier for DHEA. [8,14,15]

### **17-oksosteroidene**

Androsteron (3 $\alpha$ -hydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-on) og etiokolanolon (3 $\alpha$ -hydroksy-5 $\beta$ -androstan-17-on) har begge en oksogruppe på C-17. Disse stoffene er hovedmetabolittene til androstendion, DHEA og testosteron og blir i stor grad (> 90 %) skilt ut i urinen. Halvparten av steroidmaterialet som blir skilt ut er 17-oksosteroider, men det sees også en del dioler, trioler og andre polare metabolitter. [20]

I tillegg til androsteron og etiokolanolon finnes også følgende:

6 $\beta$ -OH-androsteron (3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -hydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-on)

6 $\beta$ -OH-etikolanolon (3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -hydroksy-5 $\beta$ -androstan-17-on)

11 $\beta$ -OH-androsteron (3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -hydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-on)

11 $\beta$ -OH-etikolanolon (3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -hydroksy-5 $\beta$ -androstan-17-on)

[10]

De sistnevnte stoffene er av interesse i dopingsammenheng, da de er blitt foreslått som markører for å detektere misbruk av androstendion. [21,22]

### **Androstandiol (5 $\alpha$ /5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) [10]**

Androstandiol foreligger som to isomere, 5 $\alpha$ - og 5 $\beta$ -androstandiol, og er begge metabolitter av testosteron. Testosteron metaboliseres til ulike stoffer, og androstandiolene utgjør bare omtrent 4 % av den totale mengde testosteronmetabolitter. [15]

### **Pregnandiol (5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -diol) [10]**

Pregnandiol er en metabolitt av progesteron, men med en mye svakere biologisk virkning enn progesteron. Forholdet mellom disse to korrelerer i de fleste kliniske situasjoner. Hos kvinner finner vi pregnandiol i urin etter ovulasjon og i store mengder under graviditet. Pregnandiol er biologisk inaktiv, men utskillelsen i urin kan bli brukt som et mål for den endogene produksjonen av progesteron. [20]

### **Pregnantriol (5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20-triol) [10]**

Pregnantriol er en metabolitt av 17 $\alpha$ -OH-progesteron, og skilles ut i urin. 17 $\alpha$ -OH-progesteron er en forløper til androstendione. [23]

### **Østradiol (3, 17 $\alpha$ -hydroksyestra-1, 3, 5(10)-trien) [10]**

Østradiol regnes som det viktigste og mest potente østrogen-hormon. Østrogener fører til utvikling av de sekundære kvinnelige kjønns tegn. Hos fertile ikke-gravide kvinner stammer østradiol nærmest utelukkende fra ovariene (follikler og corpus luteum). Hos menn er østradiol tilstede i lave konsentrasjoner i serum. Omtrent en tredjedel stammer direkte fra leydigcellene, mens resten stammer fra omdannelsen av testosteron via enzymet aromatase i leveren og i fettvevet. Menn som mangler gen for østrogenreseptor eller enzymet aromatase utvikler ofte osteoporose, dette bekrefter at østradiol har en viktig effekt på benvev. Østradiol synes også å være nødvendig for normal libido.

Postmenopausale kvinner, menn og barn har lave verdier uten syklisk variasjon.

Referanseområdet i serum er 0,06 – 0,14 nmol/L. Det er vanlig å se økning av østradiol i serum ved behandling med gonadotropiner hvis gonadefunksjon er intakt, dette gjelder særlig hos kvinner, men kan muligens også sees hos menn via økt testosteronproduksjon og dermed økt omdannelse til østradiol.

I plasma transporteres østradiol bundet til albumin (ca. 60 %) og til SHBG. Kun 2 – 3 % er fritt og dermed biologisk aktivt. [12,24]

### **Østron (3-hydroksyestra-1,3,5(10)-trien-17-on) [10]**

Østron er et naturlig forekommende østrogen på lik linje med østradiol og østriol, men med en lavere østrogen effekt.

Hos ikke-gravide kvinner i fertil alder dannes noe østron i folliklene og i corpus luteum i ovariene. Androstendion som stammer fra binyrebarken og gonadene er også opphav til østron. Androstendion blir omdannet til østron i leveren, fettvevet og andre perifere organer.

I dopingsammenheng vil ikke inntak av østron gi anabol effekt, men kan likevel være interessant som en markør ved inntak av AAS. [25]

### **Seksualhormon bindende globulin – SHBG**

SHBG produseres i leveren og er et transportprotein som i første rekke binder testosteron og dihydrotestosteron, men også i noen grad østradiol. Mengden av SHBG bestemmer andelen av frie, det vil si biologisk aktive, kjønns hormoner i blodet. På grunn av proteinets høyere affinitet til testosteron enn til østradiol vil en økning av SHBG føre til økt østrogeneffekt, mens nedsatt SHBG vil forsterke de androgene effekter. Produksjonen og dermed blodkonsentrasjonen blir også påvirket av hormonkonsentrasjonen ved at den øker ved østrogen-påvirkning og reduseres av androgener. Ved bruk av androgene-anabole steroider (AAS) hos menn sees lave verdier av SHBG. Referanseområdet i serum er 8-60 nmol/L. [9,26]

## **1.3 Gonadotropinfrisettende hormoner**

Gonadotropinfrisettende hormon (GnRH) er et decapeptid som er involvert i kontroll av reproduksjonen. GnRH frigjøres pulsatilt fra nerveterminaler i hypothalamus og regulerer utskillelsen av follikelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH) fra hypofysen.

Det antas at aktiveringen av GnRH sekresjon påvirkes av mange overordnede neurotransmittere og modulatorer som medierer informasjon om kroppsutvikling, kroppsvekt, fettlagre, energibalanse, appetitt, eksterne miljøfaktorer og hos noen arter også årstid. Uten å



gå inn i detaljene har det i løpet av de seneste år blitt klarlagt at en G protein-koblet reseptor, GPR54 og dens naturlige ligand KiSS-1 protein fungerer som en ”gatekeeper” for den pulserende frigjøring av GnRH. GPR54 uttrykkes i GnRH-neuroner, og det er påvist at KiSS-1 har en direkte aktiverende effekt på neuronene ved produksjon og sekresjon av GnRH.

GnRH reseptoren (GnRHR) utgjør det siste ledd i signaloverføringen fra hypothalamus til gonadotrope celler i hypofysen som frigjør hormonene FSH og LH. GnRHR tilhører også familien av G proteinkoblede reseptorer og er uttrykt på cellemembranen i de gonadotrope cellene i hypofysen. Som beskrevet tidligere stimulerer LH til testosteronproduksjon. [27]

## **1.4 Gonadotropiner**

Gonadotropiner (FSH, LH og hCG) er strukturelt relaterte glykoproteiner sammensatt av en felles  $\alpha$  enhet og en hormonspesifikk  $\beta$ -enhet. Hormonene produseres enten i hypofysen (FSH og LH) eller i placenta (hCG).

### **1.4.1 LH**

LH er et gonadotropin som produseres i hypofysen under påvirkning av GnRH. Hos kvinner stimulerer LH androgensyntesen, induserer ovulasjon, opprettholder corpus luteums funksjon og stimulerer denne til produksjon av progesteron. Hos menn stimulerer LH testosterondannelsen i testiklenes Leydig-celler. Se punkt 1.2.2

LH frigjøres pulsatilt (på lik linje med GnRH) og konsentrasjonen vil derfor fluktuere gjennom døgnet. Hos kvinner i fertil alder varierer konsentrasjonen i løpet av menstruasjonssyklusen. Hos voksne menn er konsentrasjonen mer konstant og svarer omtrent til basalnivået hos fertile kvinner. [28]

### **1.4.2 FSH**

FSH er på lik linje med LH et gonadotropin som produseres i hypofysen under påvirkning av GnRH. Hos kvinner stimulerer FSH granulosa-cellene i ovarienes follikler til proliferasjon og produksjon av kjønnshormonet østradiol. Hos menn stimulerer FSH testiklenes sertoliceller og kontrollerer spermatogenesisen.

FSH frigjøres pulsatilt, men variasjonen er større hos kvinner i fertil alder enn hos menn.

## 1.5 Bruk/misbruk av GnRH og LH

### GnRH

Det finnes flere ulike GnRH preparater som brukes medisinsk. To av de, Suprecur og Synarela, er tatt i bruk i denne studien. De er begge syntetiske peptidanaloger av gonadotropin frigjøringshormonet GnRH. De fleste GnRH-analogene er mange ganger mer potente enn det naturlige gonadotropinfrigjørende hormon og de gir forbigående en overstimulering av hypofysens frisetting av LH og FSH. Etter noen dager vil imidlertid effekten følges av en vedvarende nedregulering med redusert LH og FSH i blodet. Dette leder til en kortvarig stigning i nivået av androgener og østrogener, etterfulgt av et sterkt fall

GnRH preparater brukes i dag til å behandle:

- Prostatakreft
- Brystkreft
- Endometriose, symptomatisk behandling
- Forbehandling ved assistert befruktning
- Endokrin dysfunksjon
- Diagnostisk ved hypofysesvikt

[29]

I dopingsammenheng kan vi forestille oss at GnRH kan brukes i etterkant av en AAS kur, for å sette i gang egenproduksjon og redusere bivirkninger som følge av bortfall av endogene steroider. Det kan også være at den forbigående økning av LH og dermed testosteron ved kortvarig bruk også kan være interessant. Langvarig bruk gir nedgang via negativ-feedback, men denne inntreffer ikke før etter en stund. For Synarela er det beskrevet 3-4 uker. [30]

### LH

LH brukes i medisinsk sammenheng for å stimulere follikkelmodning og eggløsning hos kvinner, i behandlingen av sterilitet både hos kvinner og menn, og ved forsinket pubertet hos menn. LH kan føre til økt egenproduksjon av androgene anabole steroider (testosteron) i testiklene og er forbudt for menn både i og utenfor konkurranse. [31,33]

Etter en AAS kur kan LH teoretisk sette i gang egenproduksjonen og redusere bivirkninger som følge av bortfall av endogene steroider, men det kan virke som om misbrukere heller

bruker svangerskapshormonet, humant choriongonadotropin (hCG). Det kan skyldes at desensivering av reseptorer er et mindre problem ved bruk hCG enn ved LH. [19]

## **1.6 Legemidlene i denne studien**

Under følger er kort beskrivelse av de legemidlene som er tatt i bruk i studien. Her beskrives administrasjonsform, virkestoff og virkningsmekanisme. Felles for alle er at de normalt kun brukes av kvinner.

### **1.6.1 Luveris (Serono)**

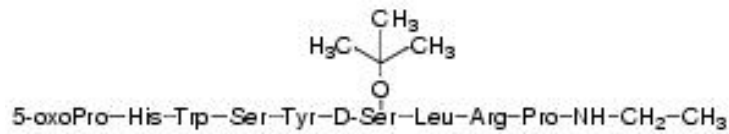
Luveris inneholder Lutropin alfa som er et rekombinant humant luteiniserende hormon (r-hLH). Det er produsert i genetisk modifiserte ovarieceller fra kinesiske hamstre. Legemiddelet injiseres subkutan og brukes sammen med follikkel stimulerende hormon (FSH) til stimulering av follikkelutvikling hos kvinner med uttalt luteiniserende hormon (LH) og FSH-mangel.

I follikkelfasen stimulerer LH til økt utskillelse av androgener fra tekacellene i ovariene. Androgenene blir omdannet til østradiol via enzymet aromatase. Østradiol støtter FSH-fremkalt follikkelutvikling. Ved midtsyklus utløser høye nivåer av LH dannelse av corpus luteum ("det gule legemet") og eggøsning. Etter eggøsning stimulerer LH progesteronproduksjon i corpus luteum ved å øke omdannelsen av kolesterol til pregnenolon.

Ved stimulering av follikkelutvikling hos kvinner med LH- og FSH-svikt er primæreffekten etter administrering av lutropin alfa en økning i østradiolutskillelse fra folliklene, mens follikkelveksten stimuleres av FSH. [32,33]

### **1.6.2 Suprecur (Aventis Pharma)**

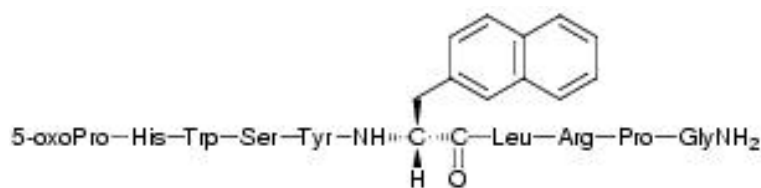
Suprecur inneholder *Buserelin* (Figur 5), en gonadotropinfrigjørende hormonanalog (LHRH-analog). Legemiddelet administreres som neseppray og brukes som forbehandling til in vitro-fertilisering for å hemme endogen hormonvirkning. Initialt stimuleres hypofysen til økt frigjøring av gonadotropinene LH og FSH, men ved fortsatt administrering vil frigjøring av gonadotropiner nedsettes via en negativ-feedback mekanisme. Dette senker konsentrasjonen av plasmaøstradiol og gir en reverserbar kastrasjonseffekt. I forbindelse med in vitro-



### 1.6.3 Synarella (Pfizer)

Synarela inneholder *Nafarelin* (Figur 6), en syntetisk dekaeptidanalogue og virker som agonist til det naturlige gonadotropinfrigjørende hormonet GnRH. Legemiddelet doseres som nesenspray og brukes ved menstruasjonsforstyrrelser, endometriose og in vitro-fertilisering (prøverørsbehandling)

Engangsdose av Synarela stimulerer frigjøring av gonadotropinene LH og FSH, som igjen gir en økning av østrogen- og testosteronproduksjonen. Ved fortsatt administrering hemmes stimulering via en negativ-feedback mekanisme, og i løpet av 3-4 uker får en i stedet en minsket gonadotropinsekresjon og/eller gonadotropiner med lavere biologisk aktivitet. På lik linje med *Buserelin* vil dette resultere i en reversibel menopausal tilstand med lave østradiolnivåer. Ved in vitro-fertilisering utnyttes effekten for å unngå prematur luteinisering og spontan ovulasjon. [30,32]



### Figur 6 - Nafarelin

## 1.7 Metabolisme

Renal ekskresjon og hepatisk metabolisme er de dominerende eliminasjonsveiene for legemidler og andre endogene stoffer som skilles ut av kroppen. For polare legemidler med begrenset lipidløselighet er renal ekskresjon den viktigste eliminasjonsvei.

Legemidler med høy lipidløselighet, som for eksempel steroider vil ikke elimineres i særlig grad ved renal ekskresjon før de eventuelt omdannes til mer polare metabolitter.

### **Biliær ekskresjon**

Molekyler med høy molekylvekt kan i de fleste tilfeller ikke skilles ut i nyrene. Løsningen er da at de skilles ut i gallen. Fordi galleveiene munner ut høyt oppe i tynntarmen, vil noen av de utskilte molekylerne kunne absorberes igjen lenger ned i tarmen. Konjugerte metabolitter, som i visse glukuronider kan dekonjugeres av bakterier i tarmen og kan dermed absorberes på nytt (enterohepatisk kretsløp). Tiden molekylet er i kroppen blir da forlenget.

### **Hepatisk metabolisme**

Den viktigste eliminasjonsvei for lipidløselige legemidler er hepatisk metabolisme.

Reaksjonene som skjer deler vi inn i to typer: fase 1-metabolisme og fase 2-metabolisme. [35]

#### **1.7.1 Fase 1-metabolisme**

Fase 1-metabolisme innebærer enzymatisk oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse, der de vanligste prosessene er hydoksylering og demetylering. Molekylene gjøres mer polare slik at de lettere kan gjennomgå renal utskillelse. [36]

Nedenfor følger en oversikt over mulige fase 1-reaksjoner for steroider. Se Figur 1 i punkt 1.2 for ringstruktur.

#### **A-ringen**

*5 $\alpha$  og 5 $\beta$ -reduksjon.* Det første og hastighetsbegrensende trinnet i metabolisme av 3-okso-4-en steroider, slik som testosteron, er reduksjon av C-4, 5 dobbelbindingen. Denne reduksjonen gir et asymmetrisk senter i C-5, noe som muliggjør dannelse av to isomere, en med 5 $\alpha$  og en med 5 $\beta$  konfigurasjon.

Reduksjon av dobbeltbindingen er reversibel, men umiddelbart etter denne reaksjonen, reduseres 3-oksogruppen. Dette er en likevektsreaksjon hvor 3 $\alpha$ -OH-steroid dehydrogenase eller 3 $\beta$ -OH-steroid dehydrogenase enzymet katalyserer både oksogrupper til hydroksygrupper og motsatt.

**B-ringen**

*6 $\beta$ -hydrosylering.* Dersom det skjer en hydrosylering i B-ringen, skjer det gjerne i form av en 6 $\beta$ -hydrosylering. Dette ser vi for metabolittene 6 $\beta$ -OH-etikolanolon og i 6 $\beta$ -OH-androsteron.

**C-ringen**

Metabolisme i C-ringen er beskjedent, men det kan skje en hydrosylering ved C11.

**D-ringen**

*17-oksidering av 17 $\beta$ -OH-gruppen.* Dette er den best kjente metabolisme for 17-OH steroidene, og det dannes en okso-gruppe ved hjelp av 17 $\beta$ -OH-steroid dehydrogenase. 17-okso metabolitter er hovedmetabolittene av testosteron og alle AAS som har en sekundær OH-gruppe. 17-okso grupper kan bli konvertert tilbake til en hydrosylgruppe ved hjelp av samme enzymet. Både androstendion, etikolanolon og androsteron har 17-okso-grupper.

*16 $\alpha$  og 16 $\beta$ -hydrosylering.* Hydrosylering av C-16 $\alpha$  og C-16 $\beta$  har blitt rapportert for flere AAS og østrogener. Hydrosylering finnes også ved 17 $\alpha$ -etyl gruppen. [36]

Mange ulike enzymer deltar i metabolismen av legemidler. For fase 1-reaksjoner er cytokrom P-450-enzymene viktigst. Dette er et enzymsystem som omfatter mer enn 50 ulike enkeltensymer, som har en sentral betydning for metabolismen av både eksogene og endogene stoffer. Aktiviteten til enzymer er bestemt ut fra genetiske forskjeller og faktorer i omgivelsene som røyking, alkohol, kostholds faktorer. Dette kan forklare mye av den store interindividuelle variasjonen i effekt og bivirkninger man ser når man gir én og samme dose av et legemiddel til forskjellige individer. [35]

**1.7.2 Fase 2-metabolisme**

Fase 2-metabolisme innebærer en konjugering med et annet molekyl, for eksempel glukuronsyre eller sulfat. Reaksjonene er enzymatisk kontrollert og målet er å gjøre molekylene mer polare. [35]

**A-ringen**

3 $\alpha$ -OH-steroider blir konjugert med glukuronsyre, mens 3 $\beta$ -OH-steroider blir utskilt som sulfater. 3 $\alpha$ -O-glukuronider er hovedmetabolittene til AAS, men noen blir også utskilt som sulfater, det gjelder blant annet androsteron, etiokolanolon, testosteron og epitestosteron.

**B-ringen**

Konjugeringer av steroider ved B-ringen er ikke kjent.

**D-ringen**

Glukuronidering av sekundære 17 $\beta$ -OH grupper er velkjent for testosteron. Det er også vist at andre AAS med sekundære 17 $\beta$ -OH-grupper også blir glukuronidert.

Sulfatering av sekundære 17 $\beta$ -OH grupper er også mulig og er beskrevet for testosteron.

**1.7.3 Metabolisme av LH, FSH, GnRH og SHBG**

LH, FSH, SHBG og GnRH er proteiner og er bygget opp av spesifikke aminosyrer. Det kan se ut som om disse proteinene mister sin biologiske aktivitet ved degradering og resirkulering.

**LH** bindes til hepatiske endotel celler og dette medfører rask eliminasjon fra sirkulasjonen.

LH blir så fraktet til lysosomer hvor nedbrytingen foregår. LH har dermed en kort halveringstid i sirkulasjon, noe som medfører kort biologisk aktivitet. [37]

Lutropin alfa som er brukt i denne studien har en halveringstid på ca. 1 time og mindre enn 5 % skilles ut i urin. [33]

**FSH** bindes til FSH-reseptorer (FSHR) og dette komplekset ser ut til å omslutes av cellen ved hjelp av endosomer. Bare en liten del av FSH og FSHR blir fraktet til lysosomer og intakt FSH blir ført tilbake til sirkulasjonen. Denne resirkuleringsmekanismen er avhengig av aminosyreresiduer nær C-terminalen av FSHR, og er avgjørende for graden av nedregulering av FSHR. [38]

**GnRH**-analoger som er brukt i denne studien er beskrevet nedenfor.

**Nafarelin** gjennomgår enzymatisk nedbryting. Seks metabolitter er påvist i større mengder i urin, men disse er trolig inaktive. 4 metabolitter er korte peptidfragmenter av nafarelin og de andre metabolittene er naphthylalanine og 2-naphthyleddiksyre. Ca. 50 % av nafarelin utskilles i urinen og 20-45 % i fæces. [30,39]

**Buserelin** inaktiveres av peptidaser i lever og nyrer (in vitro studier). I hypofysen inaktiveres reseptorbundet buserelin av membranbundne enzymer. Halveringstiden er ca. 1-2 timer etter nasal administrasjon. Buserelin og dets inaktive metabolitter utskilles via nyrene og dyrestudier tyder også på utskillelse via gallen. Stoffet skilles ut som intakt buserelin (ca 67 %) og 5-9 pentapeptider (ca 32 %). [34,40]

**SHBG** er et protein som uttrykkes under påvirkning av andre hormoner og antakelig insulin. SHBG gjennomgår enzymatisk nedbryting.

## 1.8 Analyse av endogene analytter

I denne studien analyseres både urin- og blodprøver. Urinprøvene ble analysert av studenten med hensyn på testosteron og testosteron-relatert steroidprofildata. Blodprøvene, samt LH i urin ble analysert ved hormonlaboratoriets rutineseksjon. For beskrivelse av metodene brukt i for blodprøvene og LH i urin, se punkt. 1.9.

Biologiske væsker, som urin og blod, er komplekse blandinger som inneholder blant annet proteiner og salter. Dette gjør at biologiske væsker sjelden kan analyseres direkte på instrumenter som GC og HPLC, men må opparbeides slik de kan introduseres i instrumentet. Det er flere grunner til at analysen kan være problematisk uten tilstrekkelig opparbeidelse.

- Blandingen kan inneholde ett eller flere stoffer som gir respons i analyseapparatet, men som ikke kan skilles fra respons på analytten
- Blandingen kan inneholde stoffer som kan ødelegge analyseinstrumentet
- Konsentrasjonen av analytt kan være så lav at den ikke kan detekteres (kan løses ved oppkonsentrering)

I analytisk sammenheng betraktes stoffer som interfererer med analytt eller som kan ødelegge instrumentet, som forurensninger. En prøveoppbehandling fokuserer på å fjerne disse



forurensningene enten ved å fjerne forurensningene fra prøven eller ved å isolere de aktuelle analyttene selektivt fra prøven. Hvilken strategi som benyttes, bestemmes av analyttens egenskaper, prøvens sammensetning og av konsentrasjon av analytt i prøven.

Prøveopparbeidelsen som blir brukt i denne oppgaven baserer seg på prinsippet om å isolere de aktuelle analyttene.

Hvis analytten foreligger i en lav konsentrasjon, må opparbeidelsen også fokusere på å oppkonsentrere analytten slik at analyseinstrumentet kan detektere det. [41]

### **1.8.1 Intern standard**

En intern standard er et stoff som tilsettes prøven i kjent mengde før opparbeidelsen starter. Intern standarden bør ha lignende kjemiske egenskaper som analyttent/analyttene som skal bestemmes. Ved valg av intern standard er det visse krav som må oppfylles. Stoffet bør:

- oppføre seg mest mulig likt analytten under prøveopparbeidelsen
- være separert fra andre stoffer i prøven
- ha detektorrespons som er i samme størrelsesorden som analytten
- ikke være tilstede i prøven
- være stabilt
- være tilgjengelig i ren form

Intern standard vil dermed korrigere for tilfeldige endringer eller eventuelle feil som skjer i løpet av forsøket. Endringer kan være tap av analytt under opparbeidelsen, variasjon i injeksjonsvolum og/eller variasjon under den kromatografiske analysen.

Dersom flere analytter i prøven skal detekteres kan det være nødvendig og å tilsette flere interne standarder, dersom analyttene er strukturforskjellige og/eller at retensjonstidene sprer seg utover et stort tidsintervall. [42,43]

Ved å bestemme forholdet mellom arealet av intern standard og analytt og sammenlikne dette med forhold i prøver med kjent konsentrasjon, kan det beregnes konsentrasjon av analytt i ukjente prøver. Ved bruk av massespektroskopi som deteksjonsmetode vil den ideelle intern standarden være en deuterert analog av analytten som skal bestemmes. Disse forbindelsene er

strukturlike de analyttene som skal bestemmes, bortsett fra at noen hydrogenatomer i molekylet er erstattet med deuterium som har en masseenhet høyere enn hydrogen. For å redusere interferens på grunn av naturlig isotopfordeling kan det lønne seg å bruke deutererte analoger der minst tre hydrogenatomer er erstattet med deuterium, da blir forskjellen i masse på 3 masseenheter. [44]

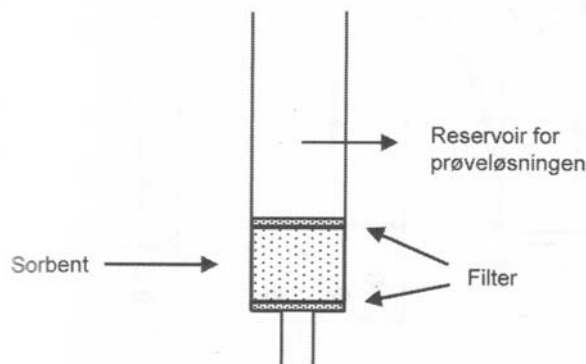
I denne studien ble det benyttet deutererte intern standarder der det var mulig å få tak i. For de resterende analyttene ble det brukt en intern standard som oppførte seg mest mulig likt. Tabell 1 viser hvilke intern standarder som ble brukt til de ulike analyttene.

**Tabell 1 Analytt og tilhørende intern standard**

<b>Analytt</b>	<b>Intern standard</b>
5 $\alpha$ -Androstandiol	d3-5 $\alpha$ -androstandiol
5 $\beta$ -Androstandiol	d3-5 $\beta$ -androstandiol
6 $\beta$ -OH-androsteron	d3-testosteron
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	d3-testosteron
11 $\beta$ -OH-androsteron	d3-testosteron
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	d3-testosteron
Androsteron	d4-androsteron
DHEA	d3-epitestosteron
DHT	d3-testosteron
Epitestosteron	d3-epitestosteron
Etiokolanolon	d5-etikolanolon
Pregnandiol	Metyltestosteron
Pregnantriol	Metyltestosteron
Testosteron	d3-testosteron
Østron	d3-epitestosteron

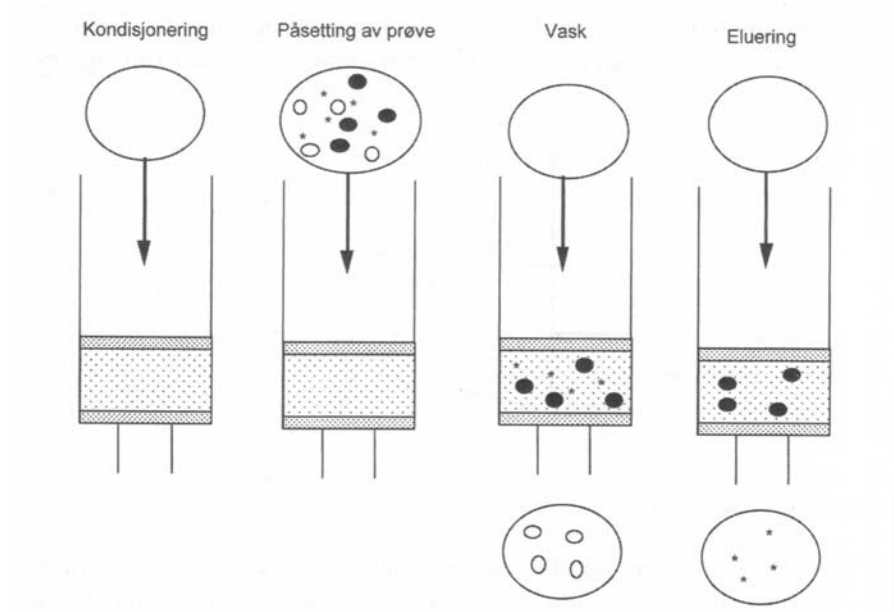
### 1.8.2 Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon (SPE, Solid-Phase Extraction) benyttes til å isolere, rense og konsentrere analytter fra væsker. Ved SPE påsettes prøveløsningen en ekstraksjonskolonne.



Figur 7 - Kolonne for SPE [45]

I denne studien er det brukt omvendt-fase ekstraksjon, prøveløsningen er vandig og kolonnen upolar ( $C_{18}$ ). SPE ekstraksjon baserer seg på stoffers evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff (sorbent) og en væske. En sorbent i ekstraksjonskolonnen retarderer analyttene av interesse, mens matrikskomponenter i prøven skylles ut. Deretter elueres analyttene ut av kolonnen og samles opp i et lite volum. Prøveløsningen blir sugd gjennom kolonnen ved hjelp av vakuum. Figur 8 viser de vanligste trinnene i en SPE.



● og ○ = forurensninger, \* = Analytt

Figur 8 - Trinn i SPE [45]

### Kondisjonering

Kondisjonering er nødvendig for å aktivere sorbenten slik at den blir i stand til å ta imot prøver. I det man starter prosessen er sorbenten tørr og de funksjonelle gruppene kan ligge sammenfoldet og det aktive overflatearealet blir da lite. Kolonnen fuktes derfor med et organisk løsemiddel, for eksempel metanol (ved omvendt-fase), for å reise opp de funksjonelle gruppene. Dette sikrer at prøveløsningen får god kontakt med de funksjonelle gruppene i sorbenten. Det organiske løsemiddelet må vaskes ut av kolonnen med et vandig løsemiddel før prøveløsningen kan settes på. Sorbenten er nå klar til å ta imot en vandig prøveløsning. Sorbenter til normalfaseekstraksjon kondisjoneres ikke med metanol, da benyttes det ofte organiske løsemidler som har lavere eller samme løsemiddelstyrke som prøveløsningen.

### Påsetting av prøveløsning

Ved prøvepåsetting vil stoffer fordele seg mellom den aktive overflaten og prøveløsningen. Det resterende av prøveløsningen blir sugd gjennom og ut av kolonnen. Målet er at analyttene av interesse skal bli fullstendig retardert i kolonnen. Betingelsene tilpasser slik at analyttene av interesse får større affinitet til sorbenten enn til prøveløsningen. I denne metoden gjøres prøveløsningen svakt sur (pH 5-6) i trinn 2 (se Figur 15). Ved denne pH vil steroidene binde seg til den upolare C<sub>18</sub> kolonnen. Polare molekyler vil ha større affinitet til den polare prøveløsningen og følge denne gjennom kolonnen.

### Vask

Ved opparbeidelse av komplekse blandinger vil ikke bare analyttene av interesse, men også forurensninger kunne retarderes i kolonnen. Det er derfor viktig å la en vaskeløsning gå igjennom kolonnen etter prøvepåsettingen for å skylle ut disse stoffene. I omvendt-fase er det vanlig å bruke vann som vaskeløsning.

### Eluering

Siste trinn i ekstraksjonen er eluering hvor det brukes et løsemiddel som har tiltrekkelig stor løsemiddelstyrke til å bryte all interaksjon mellom analytt og sorbent. Det er viktig at løsemiddelstyrken er så stor at det kan brukes et lite volum, på den måten får man oppkonsentrert prøveløsningen og hindrer unødvendig bruk av løsemidler. Det er en fordel at forurensninger som er sterkere bundet enn analyttene, ikke elueres, men blir igjen i kolonnen,

løsemiddelstyrken bør derfor ikke være for stor. Siden steroider er upolare stoffer, brukes en C<sub>18</sub>-kolonne som er upolar og som vil gi upolare interaksjonen med stoffene. [45]

### 1.8.3 Væske-væske-ekstraksjon

Basis for væske-væske-ekstraksjon (LLE, Liquid-Liquid Extraction) er egenskapen organiske stoffer har til å fordele seg mellom to ikke blandbare væsker, en vandig løsning og et organisk løsemiddel. Ved å velge rett løsningsmiddel, ionestyrke og pH, vil man kunne optimalisere fordelingen av stoffene. Valg av løsemiddel påvirkes også av den videre prøveopparbeidelsen, dersom prøveløsningen skal dampes inn bør løsemiddelet være flyktig. [46]

Valg av løsningsmiddel vil ofte bestå av kompromisser, særlig hvis man har flere analytter å ta hensyn til. Det er praktisk talt umulig å finne et løsningsmiddel, som er optimalt for alle analyttene i løsningen. Matriksen i denne studien er urin og ved å velge et upolart løsningsmiddel vil steroidene trekkes over i denne, fordi de er mer løselige der. Egnede organiske faser kan da være pentan, dietyleter og *tert*-butylmetyleter (TBME). [14]

Det optimale løsningsmiddelet for mange steroider vil være pentan, men sannsynligheten for å miste de mer polare stoffene, som østron og pregnantriol, er stor. TBME ble derfor valgt som organisk løsningsmiddel i denne studien.

### 1.8.4 Hydrolyse

Når steroidene skilles ut i urin er de blant annet konjugert med glukuronsyre. For den videre prøveopparbeidelse og analyse er det nødvendig å spalte disse konjugatene. Dette gjøres ved enzymatisk hydrolyse. Flere hydrolysemetoder er aktuelle for hydrolyse av steroider. Det mest brukte enzymet, og som også er brukt i denne studien kommer fra bakterien *E.coli*. I analyse av steroider ved dopinganalyse sees det kun på glukuronidfraksjonen og enzymet har en ren  $\beta$ -glukuronidase aktivitet og ingen arylsulfatase aktivitet. Det var tidligere vanlig å bruke et ekstrakt fra *Helix pomatia* (en snegle) som både har en  $\beta$ -glukuronidase og en arylsulfatase aktivitet. Dette ekstraktet har imidlertid vist seg å være uegnet til dopinganalyser fordi ekstraktet også har vist en  $3\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenase og en 3 oksosteroid-5,4-isomerase aktivitet. [9]

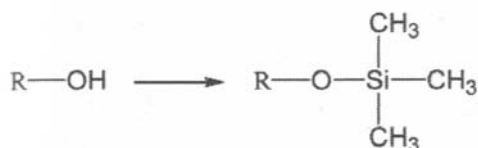
Det er viktig å ha kontroll på hvor fullstendig hydrolysen er. Det ble derfor tilsatt D<sub>3</sub>-DHT-glukuronid til intern standard blandingen. Ved å se på forholdet mellom D<sub>3</sub>-DHT og D<sub>3</sub>-

testosteron i prøven kan man vurdere hydrolysegraden. Ved fullstendig hydrolyse ligger dette forholdet rundt 0,3 i denne studien.

### 1.8.5 Derivatisering

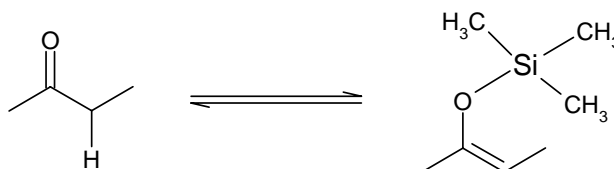
Steroider og mange legemidler generelt har polare funksjonelle grupper som for eksempel hydroksylgrupper. Slike grupper nedsetter stoffets flyktighet og kan forårsake adsorpsjon til overflater og stoffene elueres som brede topper med haledannelse. Dette kan løses ved å lage flyktige og termisk stabile derivater av analyttene, noe som er hensikten med derivatisering. Under derivatiseringen omdannes polare grupper til upolare grupper og analyttene blir bedre egnet for gasskromatografi. Derivatisering brukes også for å øke detekterbarheten av analyttene. [47,48]

Denne studien benytter N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid (MSTFA), tilsatt en  $\text{NH}_4\text{I}$  etantol løsning. Tilsetningen av  $\text{NH}_4\text{I}$  og etantol har vist å øke utbytte av derivatiseringen.  $\text{NH}_4\text{I}$  virker som en katalysator for å få trimetylsilylgruppene (TMS) på okso-grupper. MSTFA er vist å være det beste derivatiseringsreagens for steroider siden det minimerer dannelsen av multiple derivater. MSTFA vil erstatte aktive H-atomer i hydroksylgruppene på steroidene med en trimetylsilylgruppe som vist i Figur 9. [48,49]



Figur 9 - Silylering av H-atomer [48]

Dette kan også skje på oksygenet i oksogrupper, ved en keto-enol tautomerisering.



Figur 10 – Silylering etter keto-enol tautomerisering

### 1.8.6 Gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode for stoffer i gassform. Analytter som ikke er flyktige nok derivatiseres før injeksjon i GC'en som en del av prøveoppbeidelsen. I gasskromatografi er mobilfasen, også kalt bæregass, en inert gass som under trykk strømmer gjennom en oppvarmet kolonne. Det finnes to ulike kolonnetyper, kapillærkolonner og pakkede kolonner. Den førstnevnte er hul inni og dekket av en stasjonærfase på innsiden, mens pakkede kolonner er fylt av partikler som er dekket av stasjonærfase.

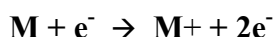
I GC er det vanlig å injisere analyttene løst i et flyktig løsemiddel. Løsemiddelet og analyttene fordampes i et oppvarmet injektorkammer ved inngangen til kolonnen. Denne gassblandingen bringes så til kolonnen av bæregassen, som frakter analyttene videre gjennom kolonnen og til detektoren. Analyttene vil fordele seg ulikt mellom stasjonærfase og bæregass og vil derfor nå detektoren i enden av kolonnen til forskjellig tid. Denne tiden blir ofte kalt retensjonstid (RT). [48]

I denne studien er gasskromatografen koblet til et massespektrometer (GC-MS). Massespektrometeret fungerer da som en detektor.

### 1.8.7 Massespektroskopi

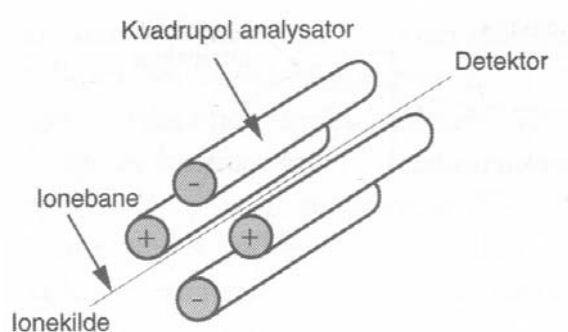
På sitt enkleste er massespektrometri (MS) en teknikk for å måle massen, altså molekylær vekt av et molekyl. I tillegg er det ofte mulig å få strukturinformasjon til et molekyl ved å måle masser av fragmentene som blir dannet når et molekyl blir brutt fra hverandre. Det er alltid forholdet mellom masse og ladning ( $m/z$ ) som blir målt. For små molekyler (ioner) er ladning i de fleste tilfellene én, slik at det som i prinsipp måles er massen. MS består enkelt forklart av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor.

Det finnes flere måter å ionisere molekyler på. I denne studien brukes elektronionisasjon (EI). EI er den mest brukte teknikken i kombinasjon med GC. Analyttene føres inn i en stråle med elektroner som kommer fra et filament av rhenium eller wolfram. Ionisering ved hjelp av EI foregår under vakuum. Analyttene blir bombardert av elektroner som kommer fra et filament av rhenium eller wolfram. Når analytten føres inn i elektronstrålen, vil det i noen tilfeller rives løs et elektron fra molekylet, som følge av elektronisk frastøtning.



$M^+$  kalles for molekyllion og har samme masse som det opprinnelige molekylet fordi vekten av det ene elektronet som ble fjernet, er neglisjerbar. De fleste molekyllionene som blir dannet ved EI er relativt ustabile og mange dem vil fort fragmentere og danne fragmenter. Disse fraktes videre til masseanalysatoren, hvor de separeres etter forholdet mellom masse og ladning. Etter masseanalysatoren finnes en detektor som registrerer mengden av ioner ved de ulike massene. Resultatene behandles elektronisk av en datamaskin og danner grunnlaget for registrering og plotting av massespektre.

De fleste instrumenter som brukes i dag er konstruert etter kvadrupolprinsippet. En kvadrupol består av 4 parallelle staver som er pålagt en elektrisk spenning. Avhengig av feltstyrken mellom stengene vil ioner med ulik masse passere gjennom kvadrupolen. Ved et bestemt forhold mellom likespenningen og vekselspenningen vil bare en  $m/z$ -verdi skape en stabil oscillasjon gjennom stavene, og bare ioner med denne  $m/z$ -verdien vil gå igjennom kvadrupolen og inn i detektoren.



Figur 11 - Skjematisk tegning av kvadrupolanalysator [50]

Hele systemet er underlagt vakuum for å unngå at ionene kolliderer med molekyler fra luften. Dette sikrer at ionene når frem til detektoren.

Massespektrometeret kan ved kombinasjon med kromatografi opereres etter to forskjellige prinsipper:

- opptak av spektre (full scan)
- selektiv ionemonitorering (SIM)

Dersom man ønsker strukturinformasjon for flere analytter, er det gunstig å ta opp massespektre under hele analysetiden. Dette kalles full scan. De separerte stoffene befinner



seg i massespektrometeret i svært kort tid og det er derfor viktig at det tas opp spektra med korte mellomrom, f.eks. 1-5 spektra per sekund. Etter analysen dannes et kromatogram ved at alle de registrerte ionenes intensitet summeres opp og plottes som funksjon av retensjonstiden. Dette gir et totalt ionestrøms kromatogram (Total Ion Current, TIC). Hver topp vil få et tilhørende massespektrum. Ved full scan får man mye strukturinformasjon, men ulempen er at følsomheten er begrenset, det kan derfor være vanskelig å detektere forbindelser i meget lave konsentrasjonsområder.

Ved analyser i lave konsentrasjonsnivåer og ved kvantitative analyser er det ikke vanlig å kjøre full scan. I slike tilfeller er det mer hensiktsmessig å stille inn massespektrometeret til kun å måle på en eller noen få karakteristiske masser gjennom hele analysetiden. Dette kalles selektiv ionemonitorering (Selective Ion Monitoring, SIM). Det vil nå plottes et massekromatogram som viser intensiteten til de(n) utvalgte massen(e) som funksjon av retensjonstiden. Analytter i løsningen som danner fragmenter med de(n) valgte massen(e) under fragmentering, vil finnes som topper i massekromatogrammet, mens andre forbindelser ikke vil vises. [50]

## **1.9 Metoder brukt ved hormonlaboratoriets rutineseksjon**

Beskrivelsen av disse metodene er begrenset, da dette er analyser studenten ikke utførte selv.

### **S-testosteron**

Til analysene er det brukt Spectria Testosterone RIA (Radio Immuno Assay) kit utgitt av Orion Diagnostics. Totalt ukonjugert testosteron måles, det vil si både proteinbundet og fritt testosteron.

#### *Prinsipp*

En kjent mengde radiomerket testosteron og en ukjent mengde umerket testosteron (fra prøven) konkurrerer om det begrensede antall bindingseter på antistoffer. Etter utvasking av ikke bundet testosteron vil mengden av radiomerket testosteron være motsatt proporsjonal med testosteron i prøven. Konsentrasjonen av testosteron i den ukjente prøven leses av på en kalibreringskurve.

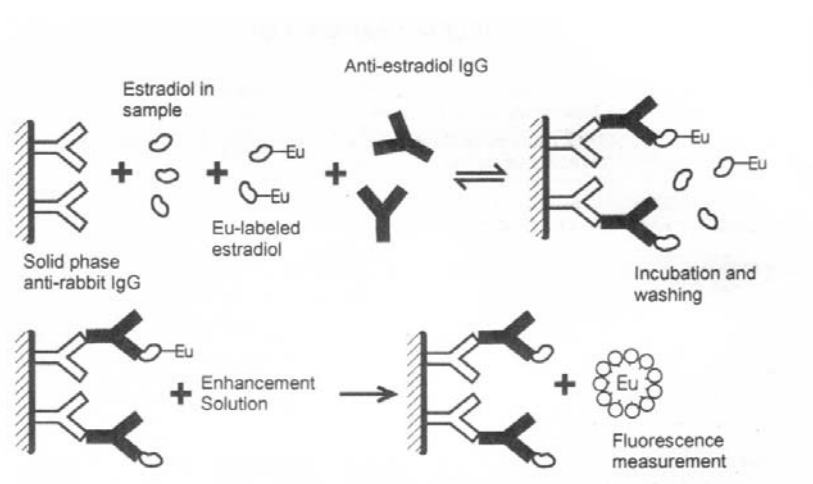
## S-østradiol

Til analysene er det brukt AutoDelfia Estradiol, utgitt av PerkinElmer.

### Prinsipp

AutoDelfia er fast-fase flouoroimmunoassay metode, basert på konkurranse mellom europium-merket østradiol og østradiol fra prøven. Østradiol fra prøven har sterkere affinitet til antistoffene enn europium-merket østradiol. Oppsettet består av fritt anti-østradiol IgG og fast-fase anti-rabbit IgG og europium-merket østradiol i kjent mengde. Se Figur 12

1. Prøven tilsettes og østradiol fra prøven bindes til frie anti-østradiol IgG
2. Østradiol-antistoff komplekset bindes så til anti-rabbit IgG i fast-fase.
3. Inkubering og utvasking. Ved utvasking vaskes alt ikke-bundet østradiol ut.
4. Et reagens (enhancement solution) tilsettes og europium fra europium-østradiol løsrives.
5. De nå "frie" europiumionene danner sterkt flourescerende chelater med komponenter i det tilsatte reagenset.
6. Fluorescensen blir målt, og denne er *motsatt proporsjonal* med konsentrasjonen av østradiol i prøven..



Figur 12 - Prinsipp for immunoassay for østradiol

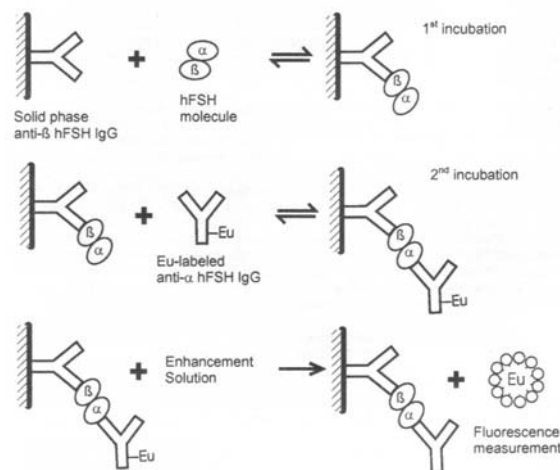
## S-FSH og S-LH

Til analysene er det brukt AutoDelfia hFSH og AutoDelfia hLH Spec, begge utgitt av PerkinElmer.

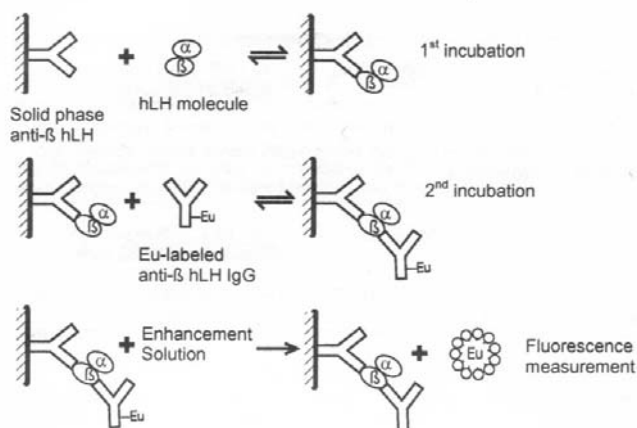
### Prinsipp

AutoDelfia er fast-fase, tosidig flouoroimmunoassay metode, hvor to antistoffer bindes til henholdsvis  $\alpha$ - og  $\beta$ -enheten i FSH, men kun til  $\beta$ -enheten (to ulike seter) i LH. Analysene foregår i to ulike kit, men er her beskrevet sammen fordi prinsippet er likt. Se Figur 13 og 14.

1. FSH/LH fra prøven bindes til fast-fase anti- $\beta$  hLH/hFSH IgG (1.inkubering).
2. Europium-merkede antistoffer tilsettes. Disse bindes til  $\alpha$ -enheten på FSH, eller til  $\beta$ -enheten til LH (2.inkubering).
3. Et reagens (enhancement solution) tilsettes og europium fra europium-merket anti- $\alpha$  hFSH IgG / anti- $\beta$  hLH IgG løsrives.
4. De nå "frie" europium ionene danner sterkt fluourescerende chelater med komponenter i reagenset som ble tilsatt.
5. Fluorescensen blir målt, og denne er *proporsjonal* med konsentrasjonen av FSH/LH i prøven.



Figur 13 - Prinsipp for immunoassay for FSH



Figur 14 - Prinsipp for immunnoassay for LH

**S-SHBG**

Til analysene er det brukt Immulite 2500 utgitt av Siemens Medical Solutions Diagnostics.

*Prinsipp*

IMMULITE 2500 SHBG er en fast-fase, tosidig chemiluminescent immunometric assay, som følger samme prinsipp som beskrevet for S-FSH og S-LH.

**1.10 Problemstilling**

Gonadotropiner, som luteiniserende hormon (LH), folikkelstimulerende hormon (FSH) eller gonadotropinfrisettende hormoner (gnRH) foreligger som genteknologisk fremstilte preparater og er forbudt å bruke for menn i henhold til WADAs dopingliste. Gonadotropinene skilles naturlig ut fra hypofysen og stimulerer den normale funksjonen til gonadene og utskillelsen av kjønnshormoner hos både kvinner og menn. Hos menn spiller FSH en viktig rolle for spermatogenesis, mens LH er viktig i forbindelse med testosteronproduksjonen.

Dette er årsaken til at stoffene kan misbrukes i dopingsammenheng. Misbruk av disse stoffene kan imidlertid ikke avsløres i dag. For å studere muligheten til påvisning av et slikt misbruk skal prosjektet undersøke hvilke mulige analyseparametere i urin og blod som er egnet til å vurdere inntak av disse forbudte stoffene. Ved denne vurderingen skal parametre som LH- og testosteronrelaterte steroidkonsentrasjoner vurderes.

Det ble benyttet allerede etablerte metoder ved Seksjon for Dopinganalyse for analyse av steroidprofildata, men validering av metodikken i forbindelse med kvantifisering vil bli gjennomført.

Valideringen ble utført i henhold til retningslinjer gitt ved Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) ved bruk av VALISTAT.exe version 1. Denne valideringsmetoden benyttes ikke ved Seksjon for dopinganalyse i dag, hensikten var dermed å se om dette bør/kan tas i bruk ved laboratoriet.

## 2 EKSPERIMENTELT

### 2.1 Forsøkspersoner

Forsøket ble godkjent av Regionalkomitè for medisinsk forskningsetikk. Forsøkspersonene fikk informasjon vedrørende studien og signerte informert samtykke før studiestart.

Det ble satt noen få inklusjonskriterier.

- Friske, frivillige menn
- Alder 18-40 år
- Ikke aktive idrettsutøvere

Aldersgruppen ble valgt ut fra antatt aldersfordeling blant toppidrettsutøvere. Antall forsøkspersoner ble satt til 30.

Forsøkspersonene ble rekruttert blant farmasi-, medisin-, vetrinærstudenter, samt andre bekjente via oppslag på de ulike studiestedene, samt e-post utsendelse. Som takk for deltakelse mottok forsøkspersonene en økonomisk godtgjørelse.

### 2.2 Organisering av forsøket

To nesespray'er og et injeksjonspreparat ble valgt til å være med i denne studien. De tre preparatene representerer to ulike grupper virkestoff, gonadotropiner og gonadotropinfrisettende hormoner. Nesesprayene ble administrert som en enkeltdose, et spray i et enkelt nesebor. LH-injeksjonen ble gitt subkutan i magen.

Forsøkspersonen ble tilfeldig delt inn i 3 grupper med 10 personer i hver gruppe. De tre gruppene fikk hvert sitt preparat, slik at 20 personer fikk nesespray og 10 personer fikk injeksjon.

For hver enkelt person gikk forsøket over 2 dager. Forsøkspersonene møtte opp om morgenen dag 1 og avga urinprøve. Før administrering av legemiddelet ble det også tatt en blodprøve. De fikk så utlevert forhåndsmerkede urinbeholdere og deltakerne samlet urin over en periode på 24 timer. Det var på forhånd bestemt at de skulle samle urin i følgende tidsintervaller; 0-3 timer, 3-6 timer, 6-9 timer 9-12 timer og 12-24 timer.

Dag 2 (til samme tid) kom forsøkspersonene tilbake for å levere urinprøvene, samt at det ble tatt en ny blodprøve. Både urin og serum ble lagret ved - 24 °C, inntil prøvene ble analysert.

Tabell 2 viser preparatene som ble benyttet og hvilken dose som ble administrert.

**Tabell 2 - Preparatene som ble benyttet og hvilken dose som ble administrert**

<b>Stoff</b>	<b>Preparat</b>	<b>Administrasjonsform</b>	<b>Administrert dose</b>
Gruppe 1 LH	Luveris	Injeksjon	1 injeksjon à 75 IE
Gruppe 2 GnHR	Suprecur	Nesespray	1 dose à 0,15 mg
Gruppe 3 GnHR	Synarela	Nesespray	1 dose à 200 µg

### 2.3 Legemidler, kjemikalier og utstyr

Alle kjemikalier som ble benyttet under opparbeidelsen og i analysen var av analysekvalitet, HPLC-kvalitet eller bedre. Tabellene under gir oversikt over preparater, steroider, kjemikalier og utstyr som ble brukt i studien

**Tabell 3 - Preparatene som ble brukt i studien**

<b>Legemiddelnavn</b>	<b>Leverandør</b>	<b>Virkestoff</b>	<b>Klassifisering</b>
Luveris	Serono	Lutropin alfa	Rekombinant humant luteiniserende hormon (r-hLH)
Suprecur	Aventis Pharma	Buserelin	GnRH-analog
Synarala	Pfizer	Nafarelin	Syntetisk decapeptid GnRH-analog

Tabell 4 - Steroidene som ble benyttet og deres leverandører

Steroider	Leverandør
D <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>4</sub> -androsteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -DHT glukuronid	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -epitestosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>5</sub> -etiokolanolon	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -testosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
Metyltestosteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
5 $\alpha$ -androstandiol	Steraloids, Rhode Island, USA
5 $\beta$ -androstandiol	Steraloids, Rhode Island, USA
6 $\beta$ -OH-androsteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
6 $\beta$ -OH-etiolanolon	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
11 $\beta$ -OH-androsteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
11 $\beta$ -OH-etiolanolon	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
Androsteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
DHEA	Steraloids, Rhode Island, USA
DHT	Steraloids, Rhode Island, USA
Epitestosteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
Etiokolanolon	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
Pregnandiol	Oraganon, Oss, Nederland
Pregnantriol	Mann Research laboratories, New York, USA
Testosteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
Østron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland

Tabell 5 - Utstyr til prøveopparbeidelsen

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Fast-fase kolonne	Bond Elut C18	Varian, Middelburg, Nederland
Fast-fase manifold	Visirep	Rohm and Haas, Philadelphia, USA
Nitrogen inndampere	Dri-Block DB-3	Techne, Hout, Oslo, Norge
Sentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettlich, Tuttlingen, Tyskland
Refraktometer	UR-1	Atago Co, Tokyo, Japan
Varmeskap	Termaks	VWR international, Oslo, Norge
Vekt	AG204 DeltaRange	Mettler Toledo, Oslo, Norge
Whirlmikser	MS2 Minishaker	IKA, Straufen, Tyskland

Tabell 6 - Kjemikalier til prøveopparbeidelsen

Kjemikalier	Leverandør
Aceton	VWR International AS, kalbakken, Norge
Ammoniumjodid	Fluka Chemika, Steinheim, Sveits
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck Eurolab AS, Stockholm, Sverige
Eddiksyre	VWR International AS, kalbakken, Norge
Etantol	Merck-Schuehardt, Hohenbrunn, Tyskland
$\beta$ -glukuronidase, <i>E.coli</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland
Saltsyre	VWR International AS, kalbakken, Norge
Metanol	VWR International AS, kalbakken, Norge
MSTFA (N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren, Tyskland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Tert</i> -butylmetyleter	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tris-(hydroksymetyl)-aminometan	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tørris	Yara, Oslo, Norge

Tabell 7 - Utstyr til GC-MS

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Autosampler	Agilent 7683 Series Injector	Matriks, Oslo, Norge
GC	Agilent 6890 Series GC system	Matriks, Oslo, Norge
MS	Agilent 5973 <i>Network</i> Mass Selective Detector	Matriks, Oslo, Norge
Data program	Agilent MSD ChemStation Software, version D0200	Matriks, Oslo, Norge



## 2.4 Løsninger

### 2.4.1 Løsninger til bruk i prøveopparbeidelsen

#### 2 M eddiksyre

114 ml eddiksyre ble fortynnet med renset vann til 1000 ml i en målekolbe.

#### 6 M saltsyre

500 ml konsentrert saltsyre (12 M) tilsettes 400 ml renset vann og fortynnes videre til 1000 ml i en målekolbe.

#### Acetatbuffer

100 ml renset vann ble blandet med 60 ml 2 M eddiksyre og 32,8 g natriumacetat ble tilsatt. pH ble justert til 5,1 med ca 5 ml 6M saltsyre ved hjelp av pH-meter.

#### 0,03 M fosfatbuffer

4,6 g kaliumdihydrogenfosfat og 5,8 g dinatriumhydrogenfosfat x 2 H<sub>2</sub>O ble fortynnet med renset vann til 1000 ml i en målekolbe. pH ble sjekket med pH-papir og lå i området 6,5-7.

#### 3 M trisbuffer

363 g tris-(hydroksymetyl)-aminometan ble veid inn i en 1000 ml målekolbe og løst i renset vann til totalt volum 1000 ml. Løsningen justeres til pH 9,8 ved å tilsette ca 35 ml 6 M saltsyre.

### 2.4.2 Derivatiseringsløsninger

#### Stamløsning (MSTFA:NH<sub>4</sub>I:etanol (1000:20:60) (volum:vekt:volum))

40 mg NH<sub>4</sub>I ble veid inn og tilsatt 2 ml MSTFA. Dette ble så varmet på varmeblokk ved ca 70 °C til alt var løst, ca 1 time. Løsningen ble avkjølt, og tilsatt 120 µl etanol.

#### Bruksløsning (MSTFA:NH<sub>4</sub>I:etanol (1000:2:6) (volum:vekt:volum))

230 µl av stamløsningen ble blandet med 2 ml MSTFA

### 2.4.3 Tillaging av intern standard til kvantifisering

Det ble i dette forsøket laget en intern standard blanding som inneholdt 7 interne standarder. D<sub>3</sub>-DHT-glukuronid ble tilsatt blandingen som en kontroll på hydrolysetrinnet i prøveopparbeidelsen. Tabell 8 viser tillagingen av bruksløsningene som ble brukt i intern standard blandingen. Tabell 9 viser tillaging og sluttkonsentrasjon.

**Tabell 8 - Tillaging av bruksløsninger for bruk av i Intern standard blanding**

Stoff	Stamløsning	Uttak	Bruksløsning
D <sub>5</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol	1 mg/ml	500 $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol	1 mg/ml	500 $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -DHT-glukuronid	1 mg/ml	500 $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -Epitestosteron	1 mg/ml	500 $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -Testosteron	1 mg/ml	500 $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
Metyltestosteron	1 mg/ml	500 $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l

**Tabell 9 - Tillaging av intern standard blanding og sluttkonsentrasjon**

Stoff	Bruksløsning	Uttak	Sluttkonsentrasjon
D <sub>5</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol	100 ng/ml	3750 $\mu$ l	15 ng/ $\mu$ l
D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol	100 ng/ml	3750 $\mu$ l	15 ng/ $\mu$ l
D <sub>4</sub> -Androsteron	1000 ng/ml	1250 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -DHT-glukuronid	100 ng/ml	2230 $\mu$ l	8,92 ng/ $\mu$ l *
D <sub>3</sub> -Epitestosteron	100 ng/ml	1250 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l
D <sub>5</sub> -Etiokolanolon	1000 ng/ml	1250 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -Testosteron	100 ng/ml	1250 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l
Metyltestosteron	100 ng/ml	1250 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l

\* (tilsvarer 5 ng/ $\mu$ l DHT)

### 2.4.4 Kalibratorløsninger

De fleste bruksløsninger, unntatt androsteron og etiokolanolon ble laget med utgangspunkt fra 1 mg/ml stockløsning. Konsentrasjon og uttaksvolum for bruksløsningene er vist i Tabell 10 og 11. Metanol ble brukt som løsningsmiddel både i bruks- og stamløsningene.

**Tabell 10 - Bruksløsning fra stamløsning**

Stoff	Stamløsning	Uttak	Bruksløsning
DHEA	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
DHT	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Epitestosteron	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Pregnantriol	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Testosteron	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Østron	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l

**Tabell 11 - Bruksløsning fra rent stoff**

Stoff	Innveid mengde	Løst i ml metanol	Bruksløsning
Androsteron	5 mg	1 ml	5000 ng/μl
Etiokolanolon	5 mg	1 ml	5000 ng/μl

Standardløsningene ble deretter laget videre fra bruksløsningene, som vist i Tabell 12.

**Tabell 12 - Tillaging av standardløsning**

Stoff	Bruksløsning	Uttak	Sluttkonsentrasjon
5α-androstandiol	1000 ng/μl	500 μl	50 ng/μl
5β-androstandiol	1000 ng/μl	500 μl	50 ng/μl
6β-OH-androsteron	1000 ng/μl	400 μl	40 ng/μl
6β-OH-etikolanolon	1000 ng/μl	500 μl	50 ng/μl
11β-OH-androsteron	1000 ng/μl	750 μl	75 ng/μl
11β-OH-etikolanolon	1000 ng/μl	500 μl	50 ng/μl
Androsteron	5000 ng/μl	1000 μl	500 ng/μl
DHEA	200 ng/μl	500 μl	10 ng/μl
DHT	200 ng/μl	500 μl	10 ng/μl
Epitestosteron	200 ng/μl	5000 μl	10 ng/μl
Etiokolanolon	5000 ng/μl	1000 μl	500 ng/μl
Pregnandiol	1000 ng/μl	500 μl	50 ng/μl
Pregnantriol	200 ng/μl	500 μl	10 ng/μl
Testosteron	200 ng/μl	500 μl	10 ng/μl
Østron	200 ng/μl	500 μl	10 ng/μl

Ut i fra standardløsningen ble kalibratorløsningene laget.

**Kalibrator 1**

0,05 ml av standardløsning ble overført til en målekolbe og metanol ble tilsatt til 5 ml.

**Kalibrator 2**

0,5 ml av standardløsning ble overført til en målekolbe og metanol ble tilsatt til 5 ml.

**Kalibrator 3**

1,5 ml av standardløsning ble overført til en målekolbe og metanol ble tilsatt til 5 ml.

**Kalibrator 4**

3,5 ml av standardløsning ble overført til en målekolbe og metanol ble tilsatt til 5 ml.

## Kalibrator 5

Har samme konsentrasjon som standardløsning.

## Kalibreringskurve

Tabell 13 viser konsentrasjonene som ble brukt i kalibreringskurvene.

Tabell 13 - Konsentrasjoner i kalibreringskurvene

Stoff	Nivå 1 (ng/ml)	Nivå 2 (ng/ml)	Nivå 3 (ng/ml)	Nivå 4 (ng/ml)	Nivå 5 (ng/ml)
5 $\alpha$ -androstandiol	10	100	300	700	1000
5 $\beta$ -androstandiol	10	100	300	700	1000
6 $\beta$ -OH-androsteron	8	80	240	560	800
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	100	300	700	1000
11 $\beta$ -OH-androsteron	15	150	450	1050	1500
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	100	300	700	1000
Androsteron	100	1000	3000	7000	10000
DHEA	2	20	60	140	200
DHT	2	20	60	140	200
Epitestosteron	2	20	60	140	200
Etikolanolon	100	1000	3000	7000	10000
Pregnandiol	10	100	300	700	1000
Pregnantriol	2	20	60	140	200
Testosteron	2	20	60	140	200
Østron	2	20	60	140	200

## 2.5 Metodeutvikling

### 2.5.1 Forarbeid

#### Fullscan

For å få informasjon om retensjonstid, fragmentering og de mest spesifikke og intense fragmentene ble det kjørt fullscan av alle analytter og intern standarder. Dette ble gjort ved å ta tilsvarende 2,5  $\mu$ g av stoffet fra en bruksløsning. Metanolen som analyttene var løst i ble så dampet av og prøven ble tilsatt derivatiseringsreagens. Etter derivatiseringen ble prøven kjørt på GC-MS.

### **Området for kalibreringskurven**

For å bestemme hvilket konsentrasjonsområde kurven for hvert enkelt stoff skulle ligge i, var det nødvendig å ha en formening om hvilke konsentrasjoner man kunne forvente seg for de ulike analyttene. For de fleste stoffene ble normalområder i urin funnet i litteraturen. [51,52].

WADA anbefaler at urinprøver som inneholder mer enn 200 ng/ml testosteron eller epitestosteron skal bekreftes med Isotop-ratio Massespektrometri (Isotope ratio mass spectrometry, IRMS). Øverste punkt på kalibreringskurven ble derfor satt til 200 ng/ml til disse to stoffene. [17]

Tilsvarende har WADA satt en grense på 10 000 ng/ml for androsteron og etiokolanolon, og øverste kalibreringspunkt for disse stoffene ble derfor satt til dette. [17]

Analyser fra blodprøvene viste en signifikant økning av østradiol og det var derfor ønskelig å inkludere østron som en analytt i urinprøvene. For å definere normalområdet for østron ble 25 urinprøver derfor opparbeidet og analysert. Samtidig ble det opparbeidet tre kontrollprøver som inneholdt henholdsvis 1, 10 og 100 ng/ml østron. Resultatene fra urinprøvene ble sammenliknet med resultatene av kontrollprøvene og området for kalibreringskurven ble bestemt ut i fra dette.

### **2.5.2 Prøveopparbeidelsen**

Seksjon for dopinganalyse har allerede en etablert prøveopparbeidelse for analyse av AAS, og det ble bestemt at denne studien skulle benytte samme prøveopparbeidelse. Figur 15 viser hvordan opparbeidelsen ble gjennomført.

Spesifikk vekt ble målt på alle urinprøver. Dersom en prøve hadde en spesifikk vekt under 1,010, ble prøveuttaket justert slik at det ble tatt ut 5 ml i stedet for 2,5 ml.

Det ble opparbeidet en kalibreringskurve og en kontrollprøve med kjent konsentrasjon for hver serie. Kontrollprøven inneholdt kjente mengder av analyttene, og de "sanne" verdiene ble sammenliknet med konsentrasjonene som ble bestemt av kalibreringskurven.

**Forarbeid**

2,5 ml urin (spesifikk vekt >1,01 gir uttak på 5 ml):

1. + 50 µl intern standard
2. + 150 µl acetatbuffer til pH 5-6  
(justeres til pH 5-6 med fortynnet HCl om nødvendig – sjekk med pH papir)

**Fast fase ekstraksjon**

3. Kolonner: C-18 Bond Elut 200mg
4. Kolonnene vaskes med 2 ml metanol
5. Kolonnene kondisjoneres med 2 ml vann
6. Prøvene appliseres på fuktige kolonner
7. Kolonnene vaskes med 2 ml vann
8. Prøvene elueres med 2 ml metanol
9. Prøvene dampes inn på heteblokk, 45-55 °C, under en strøm av nitrogen
10. Residuet løses i 100 µl metanol og 1 ml 0,03 M fosfatbuffer pH 6,5-7

**Enzymatisk hydrolyse**

11. 30 µl β-Glukuronidase tilsettes per 2,5ml urin
12. Prøvene inkuberes i heteblokk ved 50-55 °C i ca 1 time, evt. natten over ved 35-39 °C

**Væske-væske ekstraksjon**

13. Prøvene avkjøles til romtemperatur
14. pH justeres til 9,5-9,8 med 0,2 ml 3 M Trisbuffer. Sjekk med pH-papir
15. + 5 ml t-butylmetyleter
16. Prøvene ristes i ca. 2 min for hånd eller 10 min på ristemaskin
17. Sentrifugeres i ca. 10 min ved 1200-1500 rpm
18. Vannfasen fryses i aceton/tørrisbad og organisk fase helles over i rene 10 ml slipglass

**Derivatisering for GC-MS**

19. Organisk fase dampes inn på heteblokk, 45-55 °C, under en strøm av nitrogen
20. Innsiden av glassveggene skylles ned med ca 0,2 ml metanol
21. Prøvene dampes inn til tørrhet
22. + 40 µl derivatiseringsreagens
23. Derivatiseres på heteblokk ved 65-75 °C i ca. 20 min
24. Prøvene overføres til 2 ml autosamplerglass m/ insert

**Analyse ved GC-MS**

**Figur 15 – Flytskjema for prøveopparbeidelsen.**

## 2.6 Analyseparametre

Instrument: GC-MS

### 2.6.1 GC-Parametre

Tabell 14 - GC-Parametre

Kolonne	J&W Ultra 1 kapillærkolonne, kryssbundet 100 % metylsilikon, 17 m x 0,2 mm, filmtykkelse 0,11 µm
Injeksjonsvolum	1 µl
Splitt	1:20
Bæregass	Helium, 0,9 ml/min

Temperaturprogrammet som ble brukt var som følger:

- Starttemperatur 180 °C, varmes så opp med en hastighet på 3,3 °C/min til 231 °C.
- Deretter ble oppvarmingshastigheten økt til 30 °C/min, til ovnen nådde 310 °C.
- Temperaturen ble holdt konstant der i 2 min.

### 2.6.2 MS-opptaksparametre

Ionisering: Elektronionisasjon (EI)

Det ønskes høy følsomhet og instrumentet ble derfor stilt inn på single ion monitorering (SIM). Ionene som skulle måles ble valgt ut fra full scan resultatet. De ble så delt inn i grupper, og instrumentet ble programmert til å måle på massene i de ulike gruppene i bestemte tidsintervaller. Tabell 15 viser retensjonstiden for gruppene og hvilke masser som ble inkludert i hver gruppe.

Tabell 15 - Ioneprogram for MS

Gruppe 1 (5,00 min – 11,69 min)	Gruppe 2 (11,70 min – 14,69 min)	Gruppe 3 (14,70 min – 17,00)
241,10	275,20	117,10
244,10	290,20	255,20
246,10	399,30	301,20
256,20	414,30	435,30
272,20	417,30	449,30
419,30	419,30	
434,30	432,30	
438,30	434,30	
439,30	435,30	
	437,30	
	522,40	

## 2.7 Identifisering og kvantifisering

For identifikasjon av stoffene ble to ioner valgt ut for hvert stoff. Identifikasjonen foregår ved at retensjonstiden og forholdet mellom de ulike ioneintensitetene blir sammenlignet mot en kalibratorprøve. Ved gjennomgang av kromatogrammene ble det også vurdert om retensjonstiden til analytten og intern standarden sto i forhold til hverandre. [53]

For kvantifisering av analyttene ble det mest spesifikke ionet valgt ut. Tabell 16 viser identifikasjonsionene og kvantifiseringsionene og retensjonstiden til de ulike analyttene.

Tabell 16 - identifikasjonsionene og kvantifiseringsionene og retensjonstiden til de ulike analyttene.

Analytt	Identifikasjonsioner *	Retensjonstid (min)
5 $\alpha$ -androstandiol	<u>241</u> , 256	11,14
5 $\beta$ -androstandiol	<u>241</u> , 256	11,26
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	<u>522</u> , 417	12,98
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	<u>522</u> , 417	13,13
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	<u>522</u> , 417	13,63
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	<u>522</u> , 417	13,84
Androsteron	<u>434</u> , 419	10,79
DHEA	<u>432</u> , 417	12,05
DHT	<u>434</u> , 419	12,75
Epitestosteron	<u>432</u> , 417	12,54
Etiokolanolon	<u>434</u> , 419	10,97
Pregnandiol	<u>449</u> , 417	16,05
Pregnantriol	<u>435</u> , 255	15,88
Testosteron	<u>432</u> , 417	13,34
Østron	<u>414</u> , 399	12,80

\* kvantifiseringsionet er understreket



Konsentrasjonen av stoffer i urin vil variere avhengig av om urinen er konsentrert eller fortynnet. Et stort væskeinntak vil føre til fortynnet urin og dette henspiller seg i urinens spesifikke vekt. Vi kan derfor kontrollere dette ved å måle spesifikk vekt og korrigere i henhold til den målte verdien. En spesifikk vekt på 1,020 er definert som normal tetthet. Ved å korrigere konsentrasjonene ved hjelp av en formel, vil de urinprøvene med lav spesifikk vekt få konsentrasjoner som ligger noe høyere enn de målte verdiene og prøver med en høy spesifikk vekt noe lavere konsentrasjoner enn de målte verdiene.

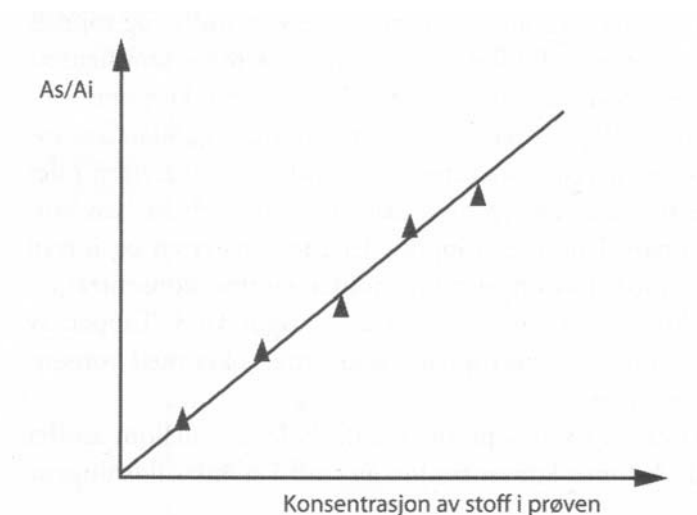
For at prøvene best mulig kan sammenlignes, ble det målt spesifikk vekt for alle prøvene og de resultatene som vises i oppgaven er korrigert for spesifikk vekt.

Denne formelen ble brukt:

$$\text{Konsentrasjon}_{\text{korrigert}} = (1,020 - 1) / (\text{Spesifikk vekt} - 1) \times \text{konsentrasjon}_{\text{ukorrigert}}$$

[17]

Standardkurven settes opp ved å plote arealforholdene mellom stoffet ( $A_S$ ) og intern standard ( $A_{IS}$ ) mot konsentrasjon av stoff i kalibratorløsningen. Intern standard er tilsatt i samme mengde til kontroller, kalibratorer og prøveløsninger.



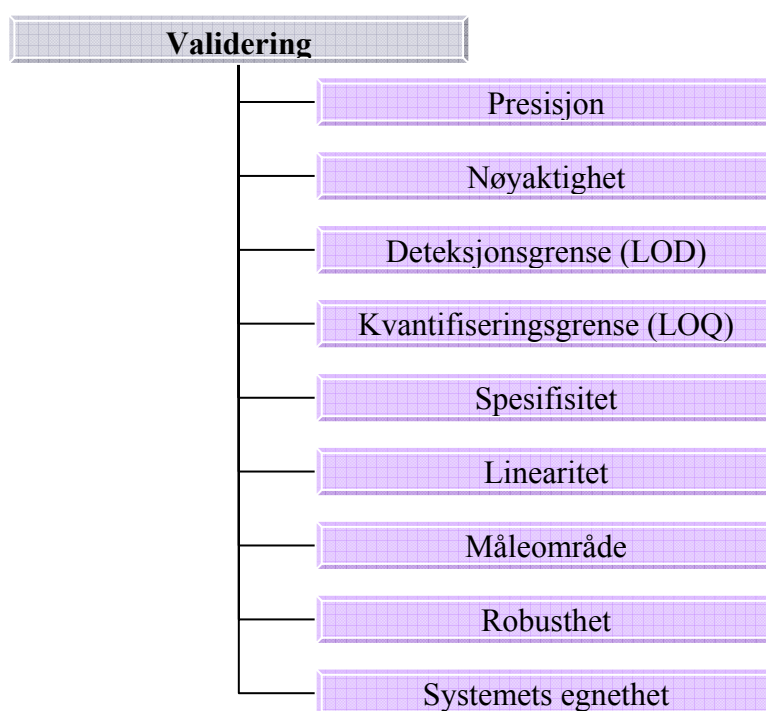
Figur 15 - Standardkurve med intern standard [43]

Arealforholdet mellom analytt og intern standard i prøven brukes til å beregne konsentrasjon av analytt ut fra standardkurven.

## 2.8 Validering

Validering er verktøyet som skal sikre at analysemetoden er egnet til å utføre oppgaven den er ment å utføre. Det er krav fra myndigheter og akkrediteringsinstanser at analysemetoder som benyttes i farmasøytisk virksomhet skal valideres. Valideringen utføres ved å kartlegge metodens egenskaper ved såkalte valideringsparametre.

Det er utarbeidet ulike internasjonale retningslinjer for validering. Disse skal sikre at en analyse gir samme resultat uansett om analysen er utført ved et laboratorium i Europa, Amerika eller Japan. WADA følger retningslinjer gitt ved International Standard for Laboratory. International Conference of Harmonization (ICH) har også utarbeidet internasjonale retningslinjer, ICH guidelines. Disse er fremkommet etter konferanser mellom USA, Japan og EU for å få ensartede retningslinjer. Figur 17 viser de valideringsparametre som vi finner i ICH guidelines. [54]



Figur 16 - Valideringsparametre etter ICH.

I denne studien ble valideringen utført etter retningslinjer gitt ved "Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie" (GTFCh) og ved bruk av den tilhørende programvaren VALISTAT version 1. Denne valideringsmetoden benyttes ikke ved Seksjon for dopinganalyse i dag, hensikten er dermed å se om dette bør/kan tas i bruk ved laboratoriet.

VALISTAT er et Excel basert program, hvor alle resultatverdiene plottes inn, hvorpå statistiske utregninger og grafer produseres automatisk. Den benyttede valideringsmetoden er noe mer omfattende en den som brukes ved Seksjon for dopinganalyse i dag. Metoden følger i stor grad retningslinjene fra ICH, men analytiske grenser (analytical limits) estimeres i henhold til DIN 32645. DIN 32645 er en tysk standardspesifikasjon som definerer deteksjon, identifikasjon og estimering av grenser ved analytiske metoder. [55]

### 2.8.1 Presisjon

Presisjon (precision) angir analyseresultatenes spredning og rapporteres vanligvis som % relativt standardavvik (CV %) for et statistisk signifikant antall prøver. Spredningen skyldes tilfeldige feil. God presisjon synliggjøres med et lavt relativt standardavvik. Hva som er akseptabelt, er avhengig av hva analysemetoden skal brukes til.

I henhold til ICH bestemmes presisjon på tre ulike måter; ”*repeatability*”, ”*intermediate precision*” og ”*reproducibility*”. De to første definisjonene finner vi igjen i GTFCh’s retningslinjer. [54,55,56]

”**Repeatability**”, på norsk kan vi si repeterbarhet. Repeterbarheten bestemmes etter gjentatte analyser under identiske betingelser over en kort tidsperiode, for eksempel i løpet av en dag. Dette kalles også ofte ”intra-assay precision” og ”intra-day precision”. [54,56]

VALISTAT version 1, bruker ”repeatability” som uttrykk og er gitt ved ”random error within the day”. Valideringen krever 2 paralleller ved 3 konsentrasjonsnivåer i 8 dager. Repeterbarhet er gitt ved CV % av alle 8 dagene, for hvert konsentrasjonsnivå. [55]

Selv om det ikke kreves mer enn 2 paralleller i henhold til GTFCh har jeg valgt å bruke 3 paralleller for å oppnå større stabilitet. Ved å velge kun to paralleller vil metoden lettere kunne påvirkes av enkeltverdier med høyere avvik enn de andre verdiene. [55]

”**Intermediate precision**”, er et resultat av spredning i analyseresultatene som fremkommer når samme prøve analyseres på samme laboratorium men på forskjellige dager, av forskjellige analytikere og eventuelt med forskjellig utstyr. På norsk kan vi si intermediær presisjon. I internasjonale publikasjoner er det vanlig å bruke uttrykket ”inter-assay precision” eller ”between-day precision”. [54,56]

VALISTAT version 1, bruker "laboratory precision" som uttrykk og er gitt ved "random errors between the days". Intermediær presisjon er gitt ved CV % av alle 8 dagene, for hvert konsentrasjonsnivå. [55]

Det er ikke et krav i henhold til GTFCh at analysen skal utføres av forskjellige analytikere, noe som også hadde vært praktisk vanskelig å gjennomføre, da denne studien utføres av en student.

**"Reproducibility"**, på norsk kan vi si reproduserbarhet. Reproduserbarheten karakteriserer analysemetodens spredning mellom forskjellige laboratorier og fremkommer som et resultat av samarbeid mellom laboratoriene. [54,56]

Reproduserbarhet er ikke et krav i henhold til retningslinjene i GTFCh og er heller ikke utført i denne analysen. [55]

### **2.8.2 Nøyaktighet**

Et analysesvar er nøyaktig hvis gjennomsnittresultatet er det samme som den sanne verdi. En analysemetodes nøyaktighet skal forsikre at det ikke er systematiske feil ved metoden og blir vanligvis angitt i prosentvis avvik fra sann verdi. Nøyaktigheten skal i følge ICH bestemmes etter et minimum av 9 enkeltanalyser for et minimum av 3 konsentrasjoner som dekker det aktuelle konsentrasjonsområdet for analytten i aktuell matriks. [54,56]

VALISTAT version 1, bruker "trueness" som uttrykk og er gitt ved "mean systematic error". Valideringen av nøyaktighet krever 2 paralleller ved 3 konsentrasjonsnivåer i 8 dager. "Trueness" er gitt ved bias i % av alle 8 dagene, for hvert konsentrasjonsnivå. Det er her også valgt 3 paralleller selv om det ikke kreves mer enn 2 i henhold til GTFCh. [55]

Det ble laget kontrollprøver i tre ulike konsentrasjoner (lav, middels og høy). Konsentrasjonene i de 3 nivåene er vist i Tabell 17.

Tabell 17 - Konsentrasjon av kontrollprøvene

Stoff	Lav konsentrasjon (ng/ml)	Middels konsentrasjon (ng/ml)	Høy konsentrasjon (ng/ml)
5α-androstandiol	10	180	560
5β-androstandiol	10	180	560
6β-hydroksyandrosteron	8	144	432
6β-hydroksyetiokolanolon	10	180	560
11β-hydroksyandrosteron	15	270	810
11β-hydroksyetiokolanolon	10	180	560
Androsteron	100	1800	5600
DHEA	2	36	112
DHT	2	36	112
Epitestosteron	2	36	112
Etiokolanolon	100	1800	5600
Pregnandiol	10	180	560
Pregnantriol	2	36	112
Testosteron	2	36	112
Østron	2	36	112

### 2.8.3 Deteksjonsgrense (LOD)

Deteksjonsgrense (Limit of detection = LOD) angir den laveste konsentrasjonen av analytt som med sikkerhet kan detekteres i aktuell matriks med den aktuelle analysemetoden.

Deteksjonsgrensen oppgis som konsentrasjon av analytt i aktuell matriks for eksempel ng/ml i urin. ICH angir flere måter for bestemmelse av deteksjonsgrense. Deteksjonen kan bestemmes som konsentrasjonen for et spesielt signal-til-støy forhold (signal-to-noise ratio = S/N ratio).

Det er vanlig at S/N = 2 eller 3 benyttes som deteksjonsgrense. [54,56]

I VALISTAT version 1, utregnes analytiske grenser (analytical limits) i henhold til DIN 32645. Figur 17 viser formelen som er brukt for LOD. [55]

$$X_{LOD} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}}$$

$X_{LOD}$	limit of detection according to DIN 32645
$s_{x_0}$	procedure standard deviation
$t$	quantile of the t-distribution
$\alpha$	probability for type I error
$m$	number of determined repetitions per concentration
$n$	number of calibration points
$\bar{X}$	mean value of all content values
$Q_x$	sum of all square deviations

Figur 17 - LOD etter DIN 32645 [55]

## 2.8.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Kvantifiseringsgrense (Limit of Quantification = LOQ) defineres som den laveste konsentrasjon av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon med den aktuelle analysemetoden. LOQ uttrykkes som konsentrasjon av analytt i aktuell matriks. LOQ kan estimeres ved å måle høyden av toppene og støyen og deretter beregne signal/støy-forholdet. Kvantifiseringsgrensen vil alltid være et kompromiss mellom konsentrasjon og presisjon og er avhengig av hva analysemetoden skal brukes til. ICH har godkjent  $S/N = 10$  som kvantifiseringsgrense, men har også foreslått andre fremgangsmåter. [54,56]

I VALISTAT version 1, utregnes LOQ i henhold til DIN 32645. Figur 18 viser formelen som er brukt for LOQ. [55]

$$X_{LOQ} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{LOQ} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

$X_{LOQ}$	limit of quantification DIN 32645
$k$	relative uncertainty of result
$s_{x_0}$	procedure standard deviation
$t$	quantile of the t-distribution
$\alpha$	probability for type I error
$m$	number of determined repetitions per concentration
$n$	number of calibration points
$\bar{X}$	mean value of all content values
$Q_x$	sum of the square deviations

Figur 18 - LOQ etter DIN 32645 [55]

## 2.8.5 Spesifisitet

Spesifisitet (specificity) angir metodens evne til å kunne estimere analytten uten interferens fra andre komponenter som kan forventes å være tilstede i prøvematriks.

For å bestemme denne ble 8 forskjellige blankprøve analysert, for å demonstrere at det ikke er andre interfererende forbindelser. 6 av prøvene var uten IS og 2 prøver var med IS. Dette ble demonstrert både med hensyn på de forskjellige analyttene og deres interne standarder. Disse analysene utelukker imidlertid ikke interferens i enkeltprøver.

I henhold til retningslinjer i GTFCh ble dette utført som første ledd i valideringen. [55]

### 2.8.6 Linearitet

Linearitet er egenskapen metoden har til å gi standardkurver hvor responsen er en lineær funksjon av konsentrasjonen innenfor et gitt måleområde. Linearitet dokumenteres ofte ved lineær regresjon. Det er vanlig å oppgi regresjonskoeffisienten som et mål på linearitet. I de tilfellene der punktene danner en helt rett linje vil regresjonskoeffisienten være 1,0. Men lavere regresjonskoeffisient kan aksepteres avhengig av hva metoden skal brukes til. ICH guidelines spesifiserer at et minimum av 5 konsentrasjonsnivåer skal brukes til å dokumentere linearitet. Retningslinjene i GTFCh krever at lineær regresjon passer bedre enn kvadratisk regresjon. Det betyr at regresjonskoeffisienten for lineær regresjon ikke bare trenger å være innenfor kravet man setter, men også bedre enn regresjonskoeffisienten for kvadratisk regresjon. Ved Seksjon for dopinganalyse er kravet for den lineære regresjonskoeffisienten satt til 0,985 for alle screeninganalyser. [54,55,56]

VALISTAT opererer med uttrykk som "*Mandel-test on linearity*" og "*F-test on variances for homogeneity*". Regresjonslinjer og de ovenstående parametrene blir videre omtalt i resultatbiten i punkt 3.1.3

For å undersøke linearitet ble det i samsvar med retningslinjer i GTFCh ble det analysert 6 parallelle standardkurver for hver analytt, med 5 punkter. Konsentrasjonene av de forskjellige stoffene brukt i standardkurven er vist tidligere i Tabell 13.

### 2.8.7 Robusthet

En metode er robust hvis analyseresultatene ikke blir signifikant påvirket av mindre endringer i de eksperimentelle variabler som kan forekomme under utførelse av analysen. Det stilles ikke krav til robusthet i GTFCh og det ble derfor ikke utført egne valideringer for robusthet i denne studien. [54,55,56]

### 2.8.8 Systemets egnethet

Testing av systemets egnethet (system suitability) skal vise at det analytiske systemet som en helhet fungerer tilfredsstillende. Testingen skal dokumentere at det analytiske systemet (apparat, elektronikk, datasystemer, operatør) fungerer tilfredsstillende både før og under analysen av ukjente prøver. Det stilles ikke krav til systemets egnethet i GTFCh. Det ble

likevel kjørt kontroller sammen med alle serier som viste at systemet fungerte som under valideringen. [54,55,56]

### 2.8.9 Gjenvinning

Gjenvinning (recovery) beskriver hvor mye analytt, i prosent, som gjenfinnes i den opparbeidede prøven. Gjenvinning vil da gi et estimat over hvor mye av analyttmengden som går tapt under prøveopparbeidelsen. Gjenvinningen ble målt ved at blankprøver ble opparbeidet i et vanlig oppsett, men standard og intern standard (i samme mengde som kontrollen) ble tilsatt etter at prøveopparbeidelsen var ferdig, men før derivatisering (før trinn 22 i flytskjema på side 15). Resultatene fra blankprøvene ble sammenliknet med kontrollprøvene. [54,55,56]

Ved analysemetoder med et derivatiseringstrinn er det ikke mulig å beregne nøyaktig gjenvinning fordi en mangler gjenvinning fra selve derivatiseringsprosessen. Det ble likevel valgt å utføre dette valideringstrinnet fordi det gir oss en indikasjon på gjenvinning for de ulike analyttene. [55]

Det ble opparbeidet 6 paralleller av både kontrollprøver og blankprøver i to forskjellige konsentrasjonsnivåer. Nivåene er vist i Tabell 18.

**Tabell 18 - Konsentrasjonsnivåene for gjenvinnings validering**

<b>Analytt/ Kalibrator</b>	<b>Nivå 1 (ng/ml)</b>	<b>Nivå 2 (ng/ml)</b>
5 $\alpha$ -androstandiol	10	700
5 $\beta$ -androstandiol	10	700
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	8	560
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	700
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	15	1050
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	700
Androsteron	100	7000
DHEA	2	140
DHT	2	140
Epitestosteron	2	140
Etiokolanolon	100	7000
Pregnandiol	10	700
Pregnantriol	2	140
Testosteron	2	140
Østron	2	140



### **3 RESULTATER**

#### **3.1 Validering**

Målet med valideringen er å se om metoden tilfredsstiller de krav som på forhånd er satt.

##### **3.1.1 Presisjon og nøyaktighet**

I følge retningslinjene i GTFCh, skal ikke CV % eller bias være mer en 15 %, ved LOQ kan man akseptere 20 %. Ved Seksjon for dopinganalyse er presisjonskravet satt til 30 % for screeninganalyser. Når det gjelder nøyaktighet, skal bias ikke overskride 25 %.

Tabell 19 - Resultater for presisjon og nøyaktighet

Stoff	Kons. ng/ml	Repeterbarhet “random error within the day”		Intermediær presisjon “precision of laboratory”		Nøyaktighet “trueness”	
		RSD, %	n	RSD, %	n	Bias, %	n
5 $\alpha$ -androstadiol	10	3,47	30	6,13	30	67,70	30
	180	3,35	30	3,60	30	-3,87	30
	560	3,83	29	4,76	29	-6,60	29
5 $\beta$ -androstadiol	10	4,60	30	7,12	30	-2,60	30
	180	3,24	30	4,23	30	-4,79	30
	560	5,13	29	6,03	29	-4,82	29
6 $\beta$ -OH-androsteron	8	11,23	28	13,96	28	-11,71	28
	144	5,66	30	10,66	30	1,46	30
	448	9,66	30	15,49	30	1,21	30
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	11,10	28	14,77	28	-16,49	28
	180	5,16	30	10,44	30	0,10	30
	560	7,11	30	12,62	30	4,38	30
11 $\beta$ -OH-androsteron	15	14,25	28	17,01	28	-17,03	28
	270	10,34	30	14,40	30	-4,06	30
	840	9,26	30	12,49	30	1,61	30
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	16,06	28	20,07	28	24,05	28
	180	13,98	30	17,79	30	-7,52	30
	560	11,29	30	15,45	30	-0,49	30
Androsteron	100	5,22	30	8,22	30	14,51	30
	1800	3,36	30	3,82	30	-0,52	30
	5600	4,22	30	4,99	30	-3,61	30
DHEA	2	13,20	28	17,96	28	-19,55	30
	36	5,99	30	12,23	30	-8,62	30
	112	10,63	30	18,68	30	-2,33	30
DHT	2	10,65	28	12,45	28	0,14	28
	36	6,18	30	8,04	30	-6,25	30
	112	8,41	30	12,54	30	-0,53	30
Epitestosteron	2	4,38	30	7,07	30	12,27	30
	36	3,36	30	4,03	30	-2,12	30
	112	3,37	30	4,46	30	-1,18	30
Etikolanolon	100	5,71	30	8,42	30	-2,99	30
	1800	3,41	30	4,28	30	-6,12	30
	5600	3,51	30	3,82	30	-5,28	30
Pregnanadiol	10	11,48	28	19,70	28	-17,80	28
	180	6,04	30	14,14	30	-18,51	30
	560	13,56	28	17,01	28	-38,81	28
Pregnantriol	2	23,50	27	29,67	27	40,86	27
	36	14,42	27	28,96	27	3,10	27
	112	9,26	30	27,85	30	22,39	30
Testosteron	2	4,19	28	6,76	28	13,43	28
	36	3,55	30	4,12	30	-0,58	30
	112	3,25	30	4,05	30	-0,81	30
Østron	2	12,87	28	15,69	28	-8,36	28
	36	6,06	30	12,61	30	-2,04	30
	112	9,55	30	17,32	30	1,14	30

### 3.1.2 LOD og LOQ

LOD og LOQ i VALISTAT ble beregnet etter avanserte formler og det viste seg at resultatene ikke kunne brukes i denne studien fordi kravene var satt alt for strengt.

I en screeninganalyse vil ikke kravene være like høye. Det ble derfor bestemt at LOD og LOQ skulle bestemmes etter prinsippet som normalt sett brukes ved Seksjon for dopinganalyse for screeninganalyser.

$$\text{LOD} = \text{SD} * 3$$

$$\text{LOQ} = \text{SD} * 10$$

SD = Standard avviket for den laveste konsentrasjonen.

**Tabell 20 - LOD og LOQ for stoffene.**

Stoff	Deteksjonsgrense LOD (ng/ml)	Kvantifiseringsgrense LOQ (ng/ml)
5 $\alpha$ -androstandiol	2,99	9,97
5 $\beta$ -androstandiol	2,03	6,75
6 $\beta$ -OH-androsteron	2,91	9,71
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	3,63	12,10
11 $\beta$ -OH-androsteron	6,27	20,89
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	4,50	15,01
Androsteron	27,51	91,69
DHEA	0,85	2,83
DHT	0,74	2,46
Epitestosteron	0,46	1,54
Etiokolanolon	23,92	79,75
Pregnandiol	4,72	15,73
Pregnantriol	2,46	8,23
Testosteron	0,45	1,49
Østron	0,85	2,84

### 3.1.3 Linearitet

Linearitetstesten i VALISTAT version 1 viste seg å være meget avansert. Valideringen av linearitet, ble i henhold til kravene i programmet, ikke godkjent for noen av analyttene.

På grunnlag av de avanserte målemetodene i VALISTAT version 1, ble det bestemt at lineariteten skulle vurderes ut i fra den oppnådde regresjonskoeffisienten, uavhengig av homogenitet og Mandel-testen.

Tabell 21 - Korrelasjonskoeffisienten for stoffene i valideringen.

Stoff	DAG 1	DAG 2	DAG 3	DAG 4	DAG 5	DAG 6	Gjennomsnitt
5 $\alpha$ -androstandiol	1,000	1,000	0,999	0,998	0,997	0,992	0,998
5 $\beta$ -androstandiol	1,000	1,000	1,000	1,000	0,995	0,991	0,998
6 $\beta$ -OH-androsteron	0,997	0,999	0,997	0,960	0,954	0,989	0,983
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	0,997	1,000	0,998	0,961	0,955	0,989	0,983
11 $\beta$ -OH-androsteron	0,995	0,999	0,999	0,919	0,955	0,989	0,976
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	0,995	0,998	0,999	0,892	0,955	0,989	0,971
Androsteron	0,998	1,000	1,000	1,000	0,998	0,994	0,998
DHEA	0,996	1,000	0,995	0,934	0,927	0,986	0,973
DHT	0,996	1,000	0,995	0,957	0,963	0,985	0,983
Epitestosteron	0,999	1,000	1,000	1,000	0,997	0,994	0,998
Etikolanolon	0,999	1,000	1,000	1,000	0,997	0,992	0,998
Pregnandiol	0,999	1,000	0,992	0,941	0,941	0,980	0,976
Pregnantriol	0,996	0,992	0,996	0,940	0,962	0,944	0,972
Testosteron	0,999	1,000	1,000	1,000	0,998	0,995	0,999
Østron	0,997	1,000	0,996	0,936	0,921	0,989	0,973

### 3.1.4 Gjenvinning

Gjenvinning sier noe om hvor mye av prøven som går tapt under prøveopparbeidelsen. I henhold til krav i GTFCh er gjenvinning validert for to ulike konsentrasjoner for hver av analyttene. Resultatene er vist i Tabell 22

Tabell 22 – gjenvinning for to ulike konsentrasjonsnivåer

Stoff	Konsentrasjon ng/ml	Gjenvinning (%)
5 $\alpha$ -androstandiol	10	91,76
	700	99,83
5 $\beta$ -androstandiol	10	94,23
	700	97,12
6 $\beta$ -OH-androsteron	8	91,66
	560	95,23
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	86,49
	700	91,08
11 $\beta$ -OH-androsteron	15	96,66
	1050	99,85
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	95,98
	700	98,45
Androsteron	100	91,69
	7000	98,85
DHEA	2	90,77
	140	99,08
DHT	2	107,33
	140	100,75
Epitestosteron	2	100,77
	140	109,77
Etikolanolon	100	92,88
	7000	96,33
Pregnandiol	10	87,95
	700	96,38
Pregnantriol	2	92,04
	140	92,82
Testosteron	2	99,12
	140	107,49
Østron	2	109,68
	140	101,01

### 3.2 Fremstilling av resultatene fra prøvene

Resultatene blir fremstilt ved hjelp av box-and-whisker plot produsert i MedCalc statistical software. For urinprøvene er det i tillegg strukket en linje mellom gjennomsnittet i de ulike gruppene. Selve boksen er farget i tre ulike farger som hver representerer et preparat. Luveris er beige, Suprecur er grønn og Synarela er blå.

Boksen i boks-plottet representerer verdier fra den nedre kvartil (Q1) til den øvre kvartil (Q3). Q3-Q1 utgjør det interkvartile området, IQR (Inter Quartile Range), hvor 50 % av alle verdiene ligger i. Den midtre streken viser medianen, mens punktet i boksen viser

gjennomsnittet. Gjennomsnittet er markert med en rød prikk inne i boksen. De horisontale linjene er tegnet ved den laveste og den høyeste verdi. Ekstreme verdier (outliers) tegnes utenom de horisontale linjene.

MedCalc definerer to type *outliers*.

1. En "*outside value*" er en verdi som er mindre enn  $Q1 - 1,5 \times IQR$ , eller større enn  $Q3 + 1,5 \times IQR$  (merket med rød prikk)
2. En "*far out value*" er en verdi som er mindre enn  $Q1 - 3 \times IQR$ , eller større enn  $Q3 + 3 \times IQR$  (merket med rødt kryss)

### 3.3 Blodprøver

Det ble målt på 5 ulike stoffer i serum. Det ble tatt to blodprøver av hver person, en før administrering av legemiddelet og en dagen etter administrering. Det ble valgt å se etter signifikante forskjeller mellom dag 1 og dag 2 innenfor hvert stoff.

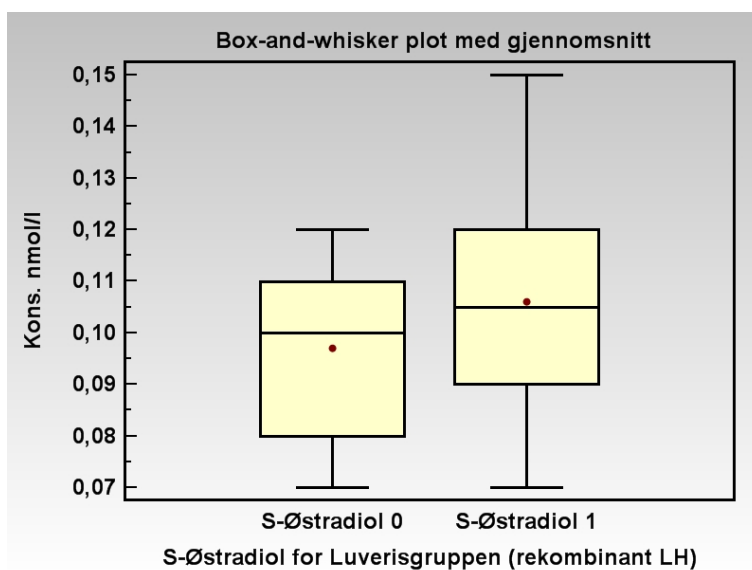
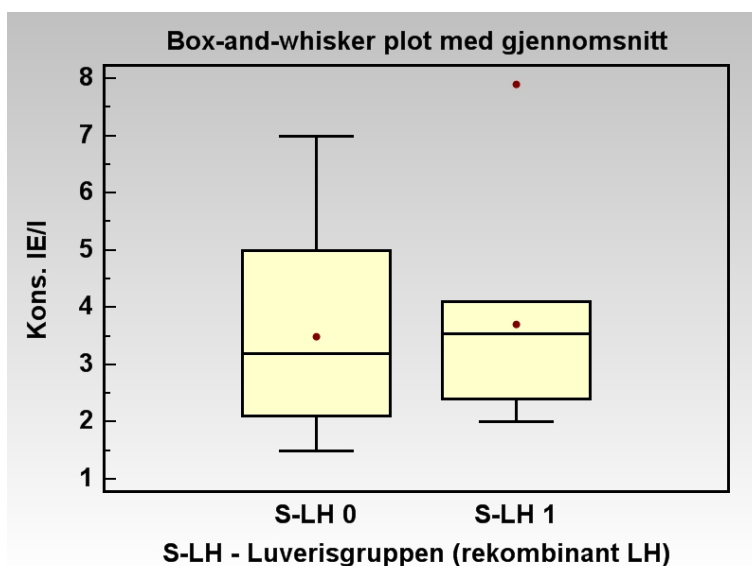
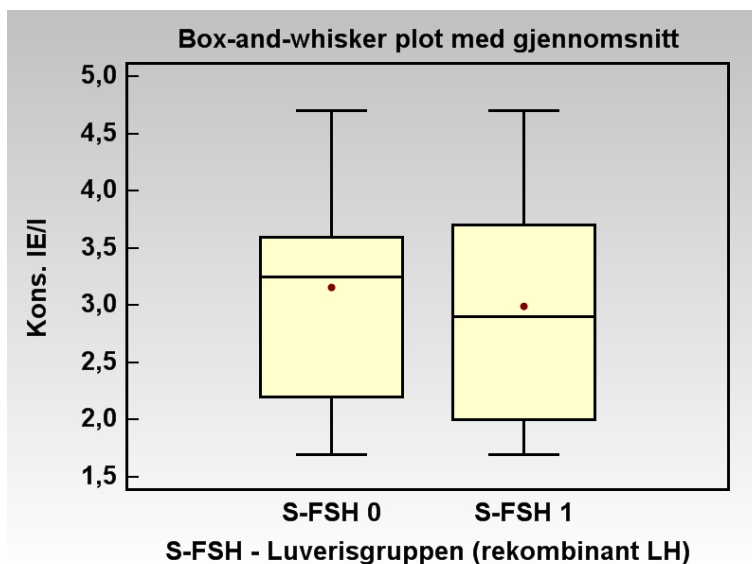
#### 3.3.1 Luveris

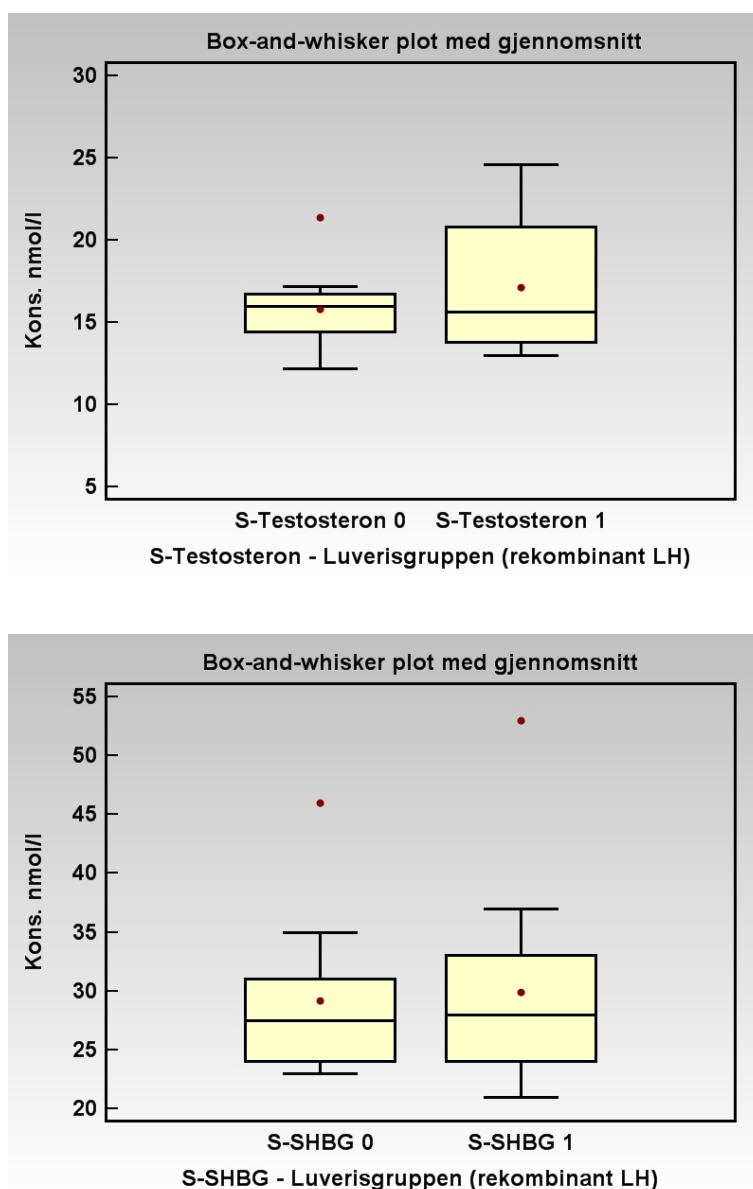
I den gruppen som fikk Luveris ble det ikke funnet signifikante forskjeller med hensyn på de stoffene det ble målt på i serum. Se Tabell 23 for p-verdier. En forskjell er signifikant dersom  $p \leq 0,05$ .

Tabell 23 - p-verdier for de ulike stoffene målt på i serum etter inntak av Luveris

Preparat	Stoff	p-verdi	Gjennomsnittelig endring
Luveris	S-FSH	0,1379	Redusering
Luveris	S-LH	0,8827	Stigning
Luveris	S-østradiol	0,0947	Stigning
Luveris	S-testosteron	0,3265	Stigning
Luveris	S-SHBG	1,000	Stigning

Under følger boks-plot for S-FSH, S-LH, S-østradiol, S-testosteron og S-SHBG for Luverisgruppen





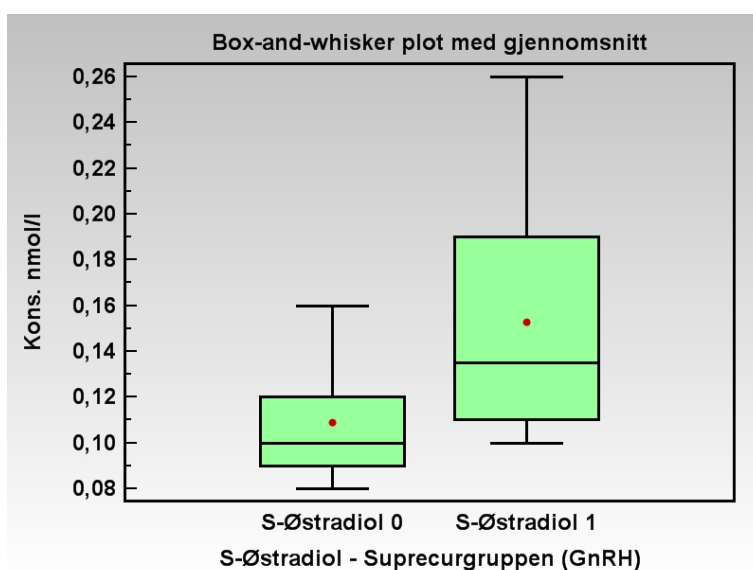
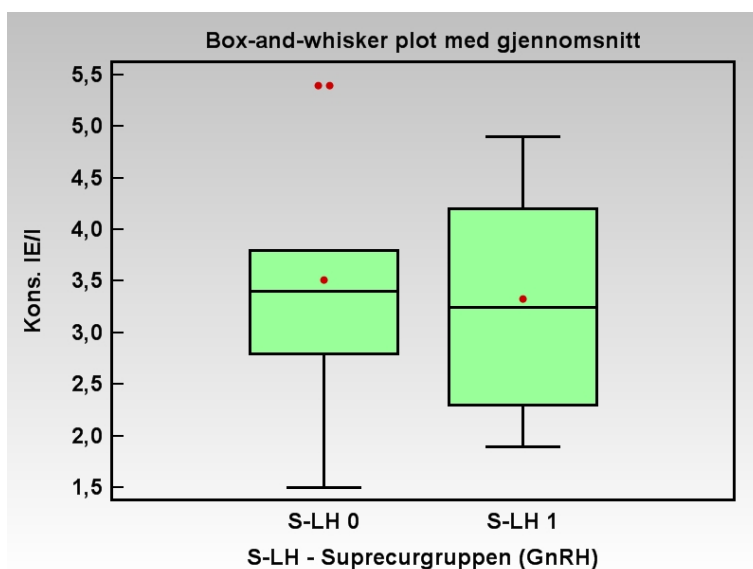
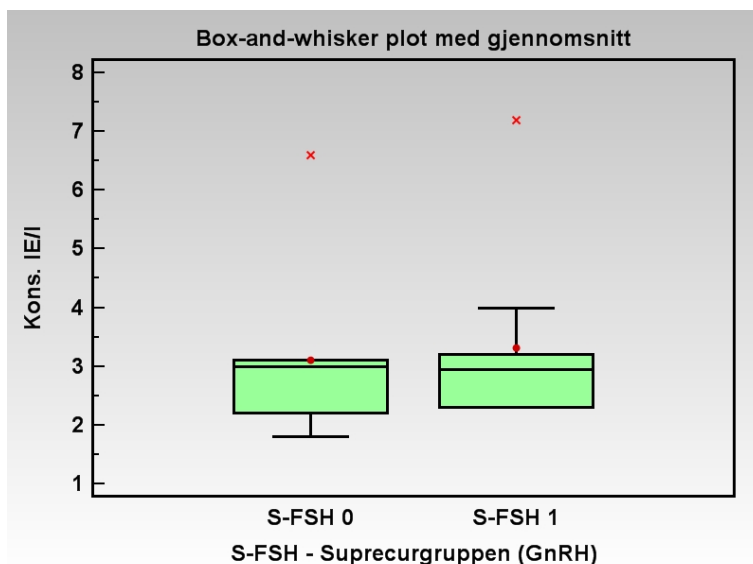
### 3.3.2 Suprecur

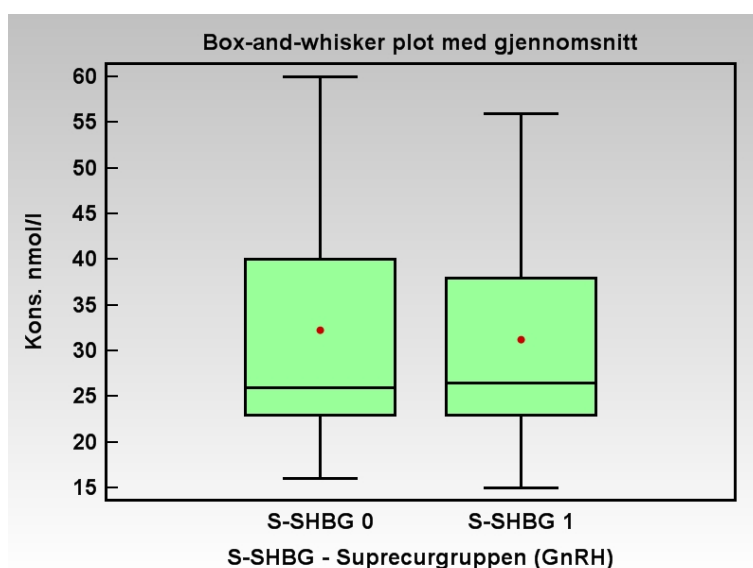
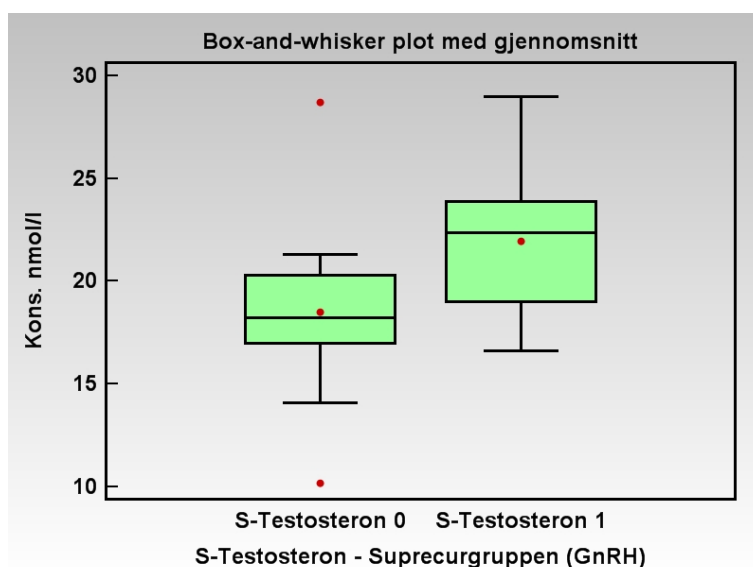
I gruppen som fikk Suprecur ble det funnet signifikante forskjeller for S-testosteron og S-østradiol i serum. Se Tabell 24 for p-verdier.

**Tabell 24 - p-verdier for de ulike stoffene målt på i serum etter inntak av Suprecur**

Preparat	Stoff	p-verdi	Gjennomsnittelig endring
Suprecur	S-FSH	0,1614	Økning
Suprecur	S-LH	0,8827	Redusering
Suprecur	S-Østradiol	0,0050	Økning
Suprecur	S-Testosteron	0,0273	Økning
Suprecur	S-SHBG	0,0751	Redusering





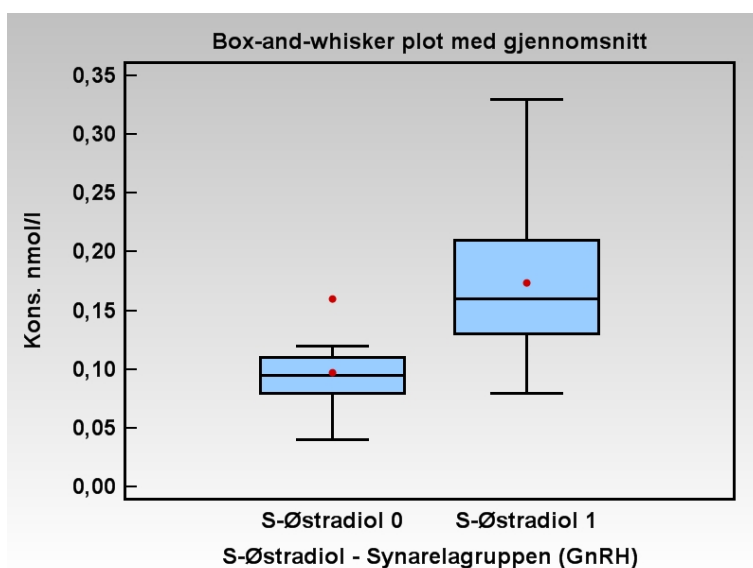
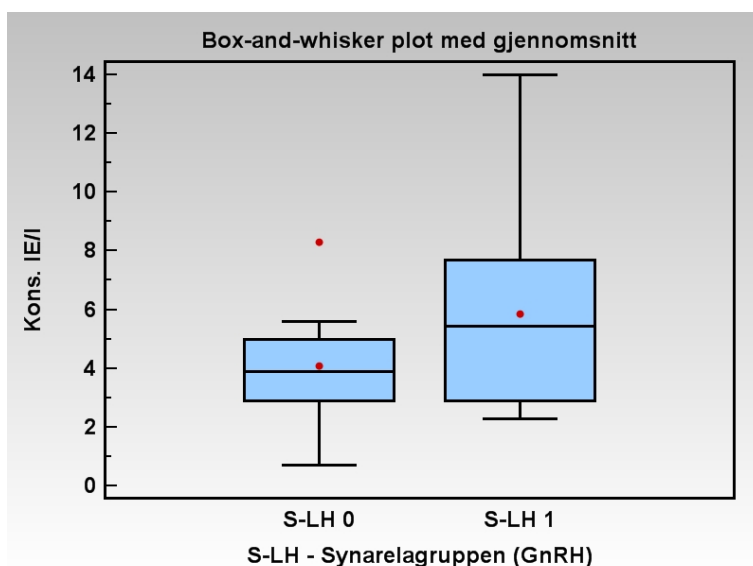
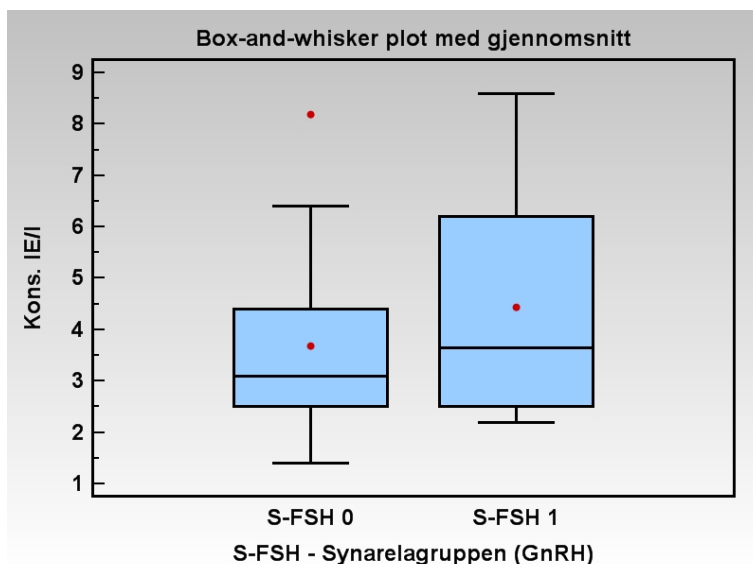


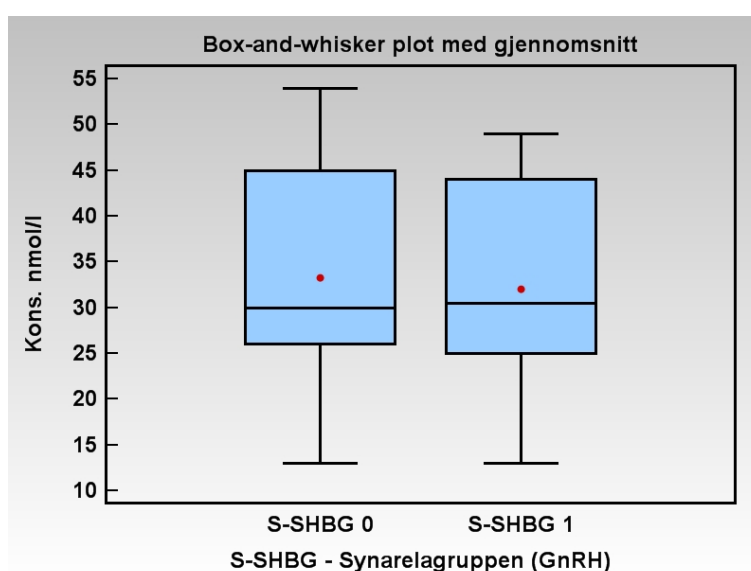
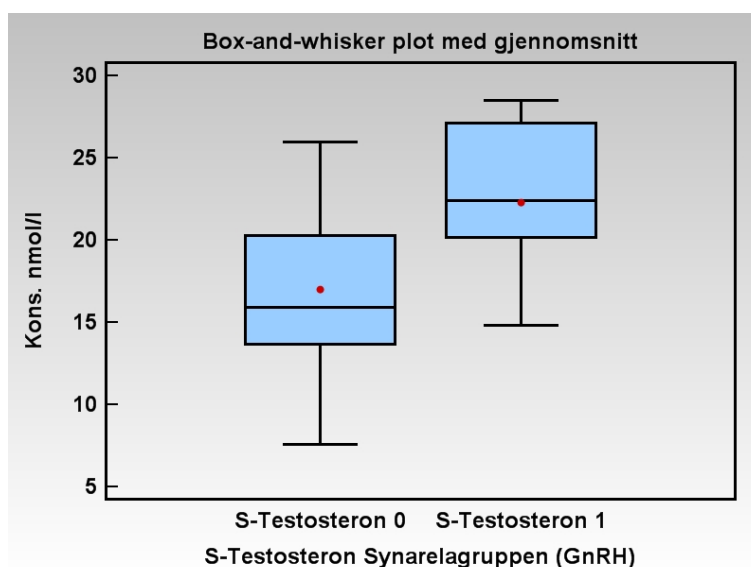
### 3.3.3 Synarela

I gruppen som fikk Synarela ble det funnet signifikante forskjeller for S-testosteron, S-østradiol og S-FSH i serum. Se Tabell 25 for p-verdier.

Tabell 25 - p-verdier for de ulike stoffene målt på i serum etter inntak av Synarela

Preparat	Stoff	p-verdi	Gjennomsnittelig endring
Synarela	S-FSH	0,0173	Økning
Synarela	S-LH	0,1042	Økning
Synarela	S-Østradiol	0,0014	Økning
Synarela	S-Testosteron	0,0378	Økning
Synarela	S-SHBG	0,1154	Redusering



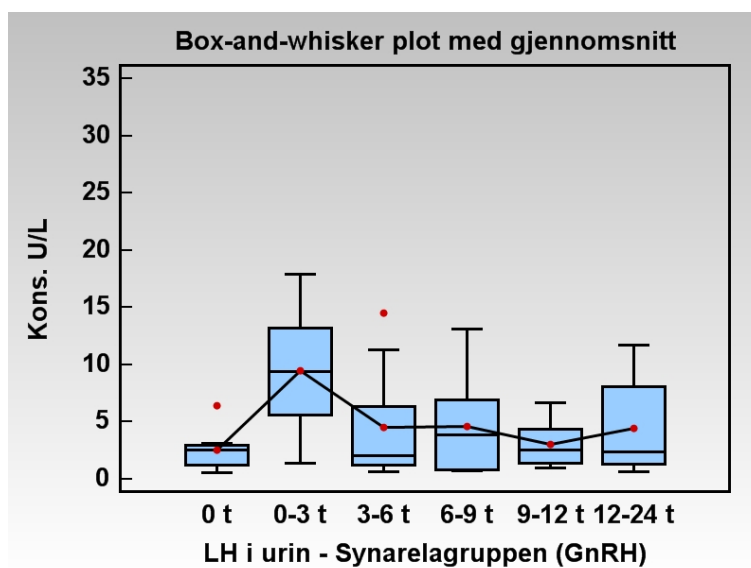
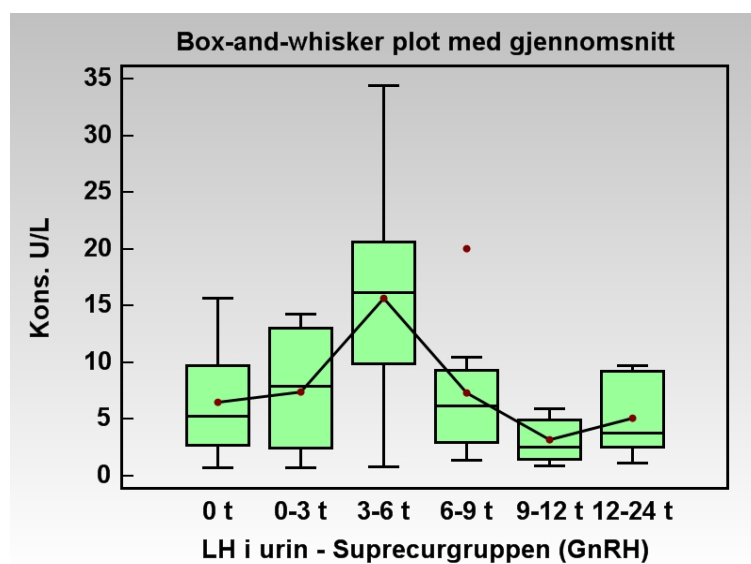
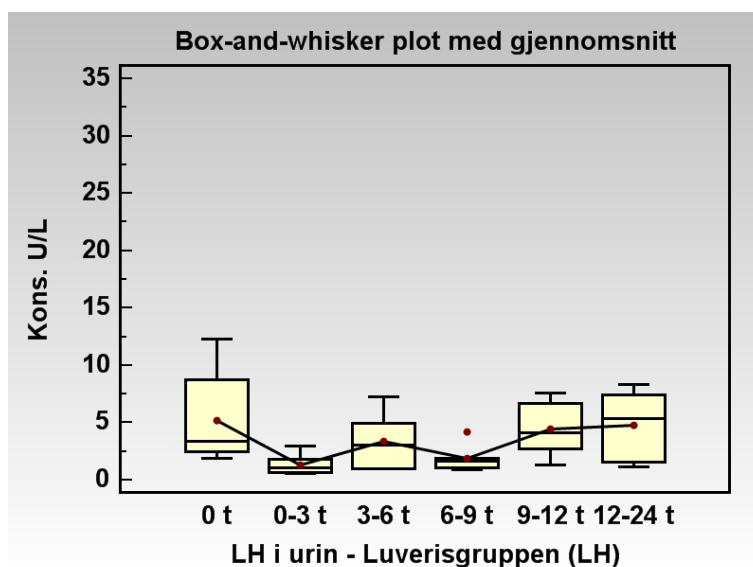


### 3.4 Urinprøvene

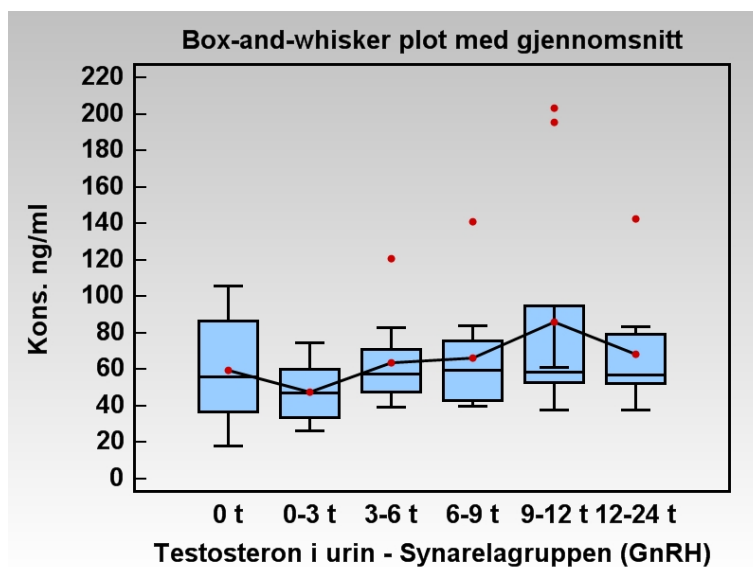
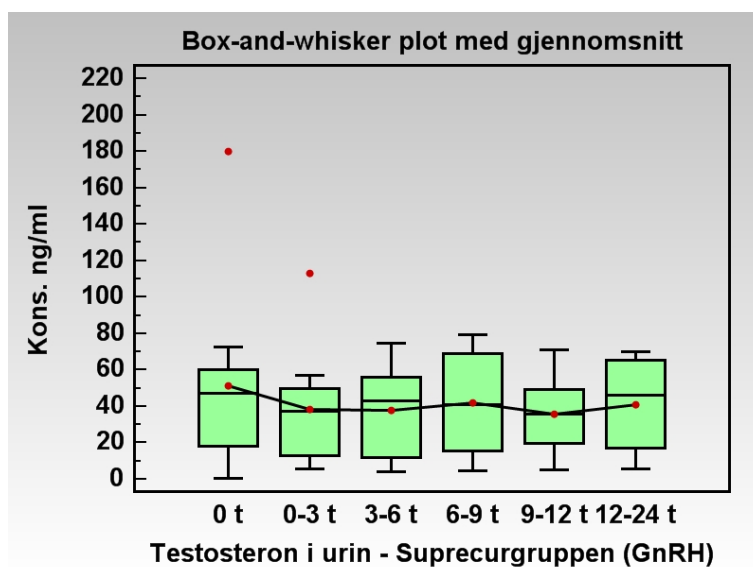
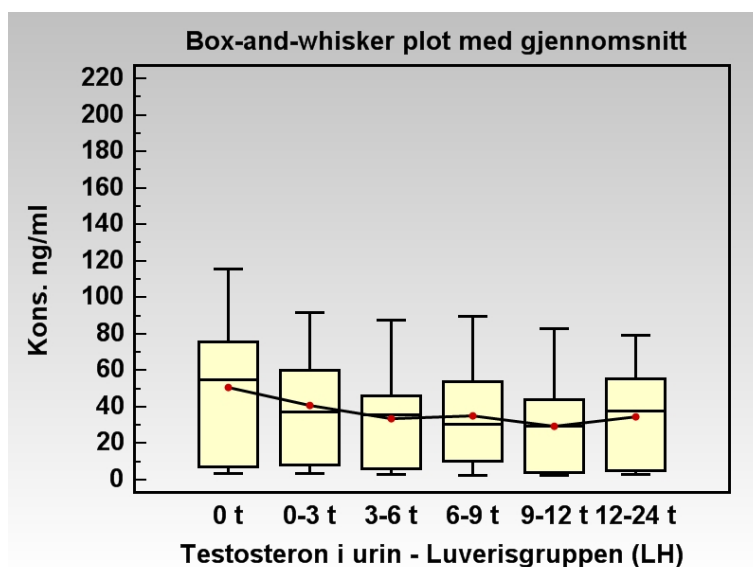
Det ble målt på 14 ulike stoffer i urin ved hjelp av GC-MS. I tillegg ble det gjort LH analyser i urin ved hjelp av flouoroimmunoassay. Det ble funnet svært lite eller intet pregnandiol. I de tilfellene hvor det fantes en topp for DHT var den forstyrret av en interferens slik at arealbestemmelse ble svært vanskelig. Resultatene for pregnandiol og DHT er derfor ikke vist.

Det ble vanskelig å sammenlikne resultatene med normalverdier da de aller fleste verdiene er innenfor normalområdet og studien heller ikke omfatter en kontrollgruppe. Det var derfor hensiktsmessig å sammenlikne de tre gruppene med hverandre. Resultatene for urin er derfor presentert per analytt, per tidsintervall for utskillelse.

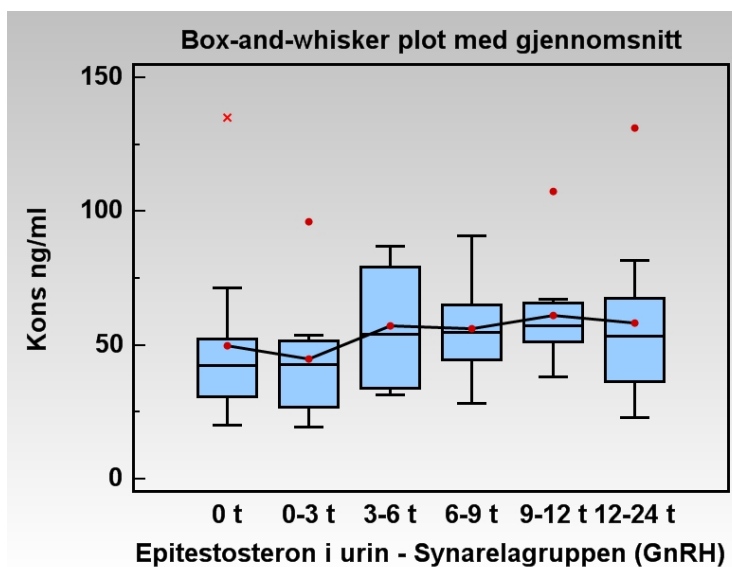
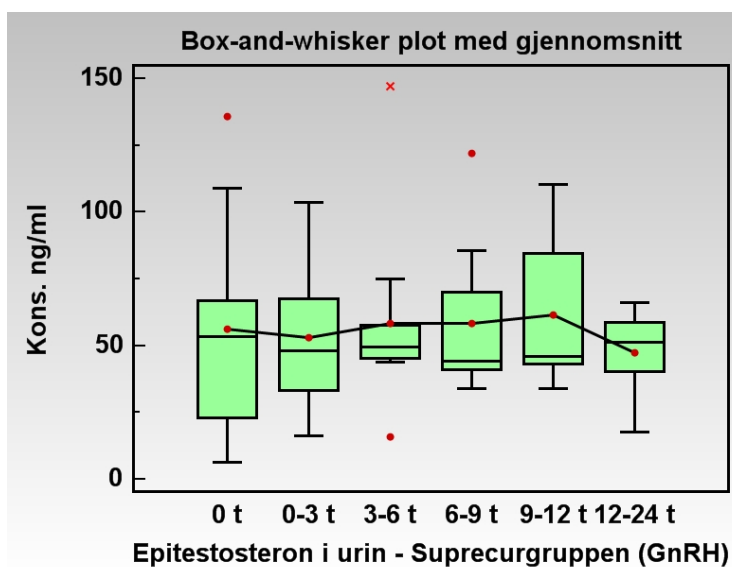
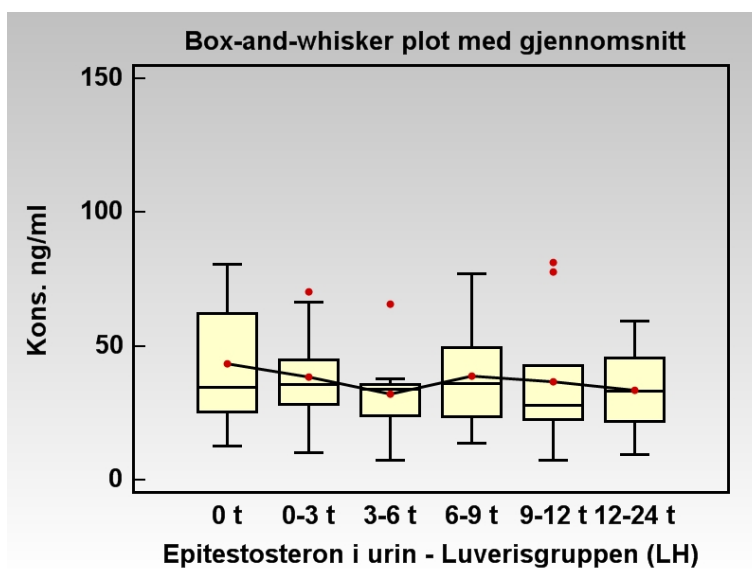
## 3.4.1 LH målt ved immunoassay



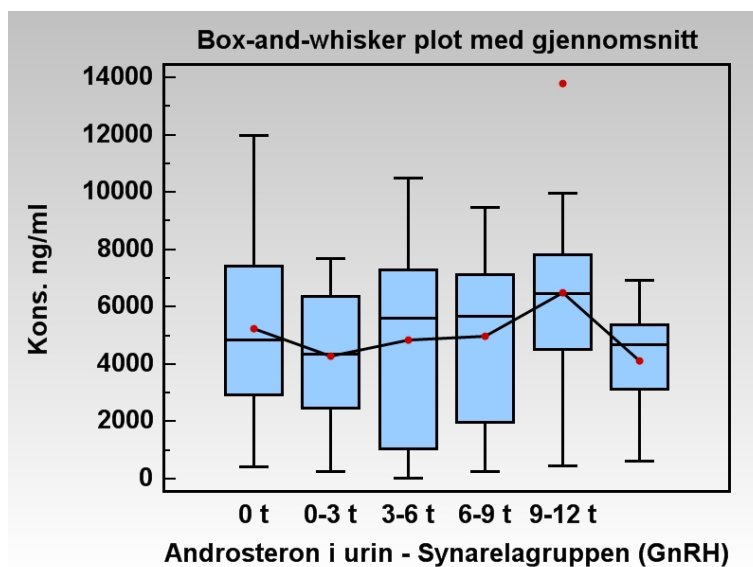
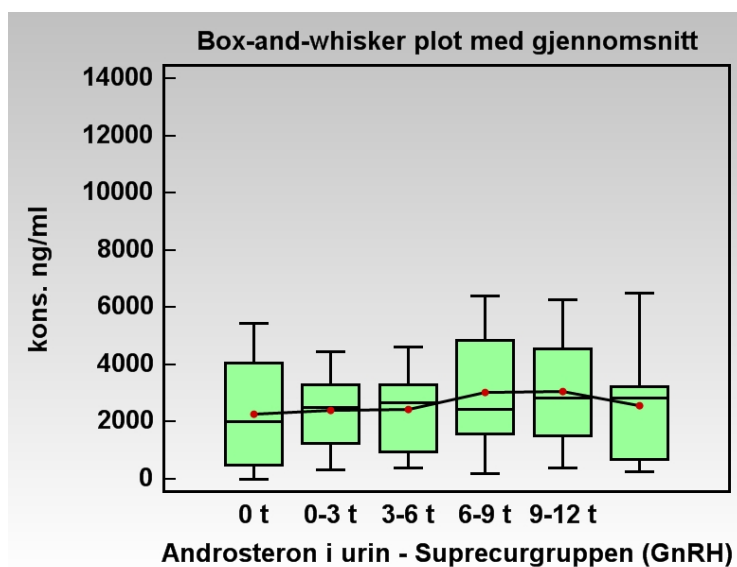
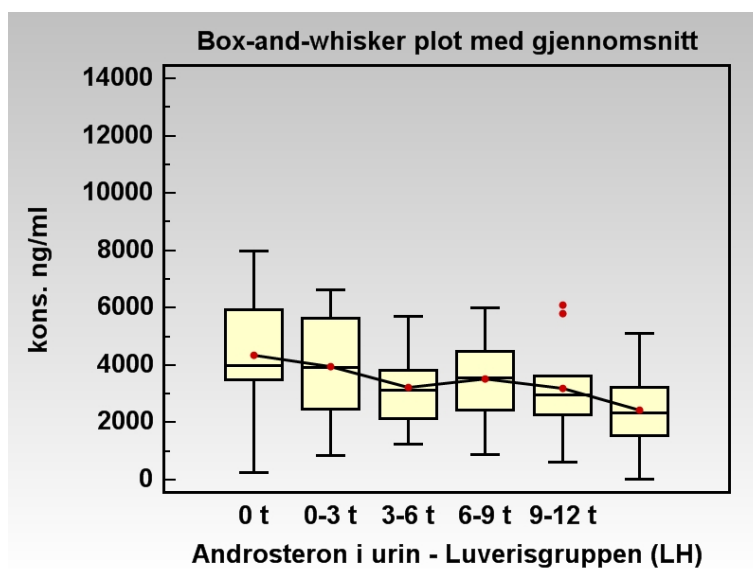
### 3.4.2 Testosteron



### 3.4.3 Epitestosteron

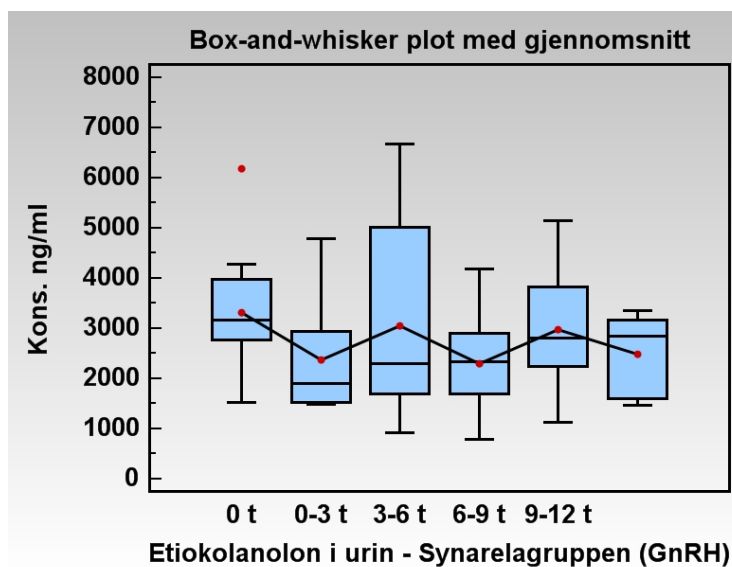
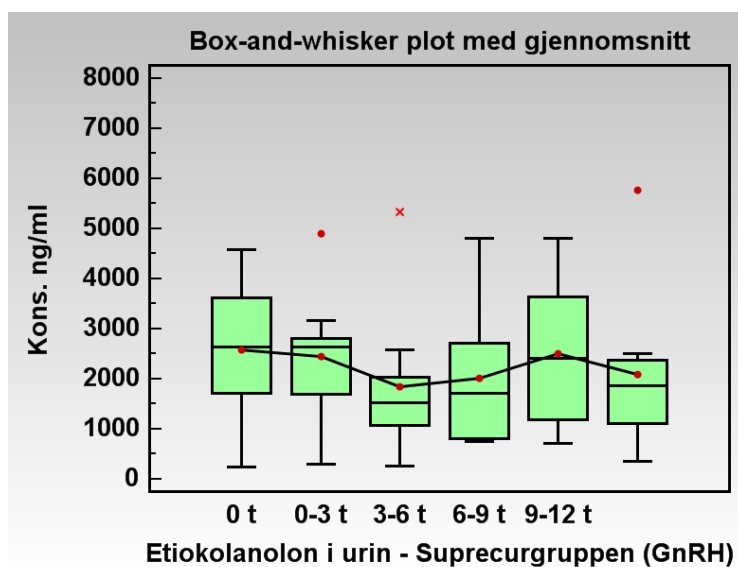
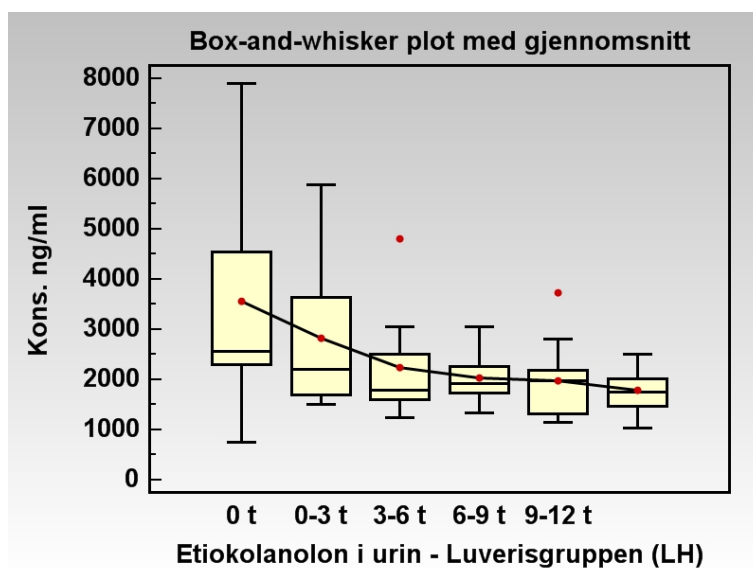


## 3.4.4 Androsteron

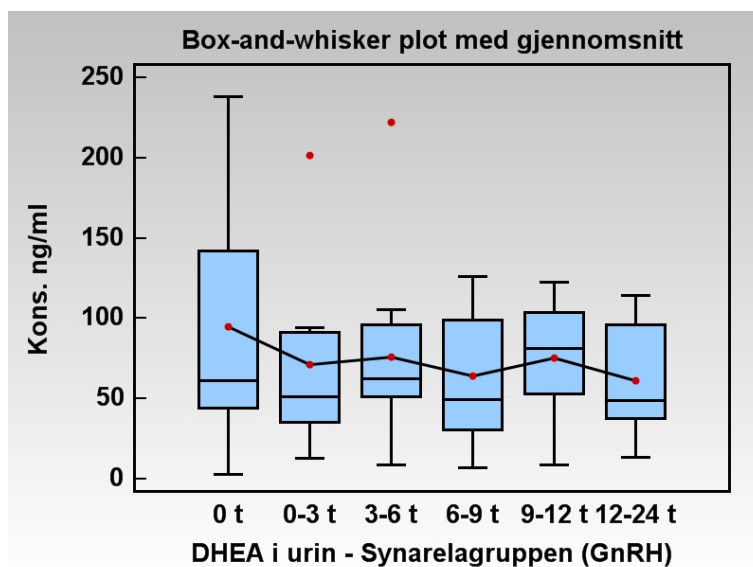
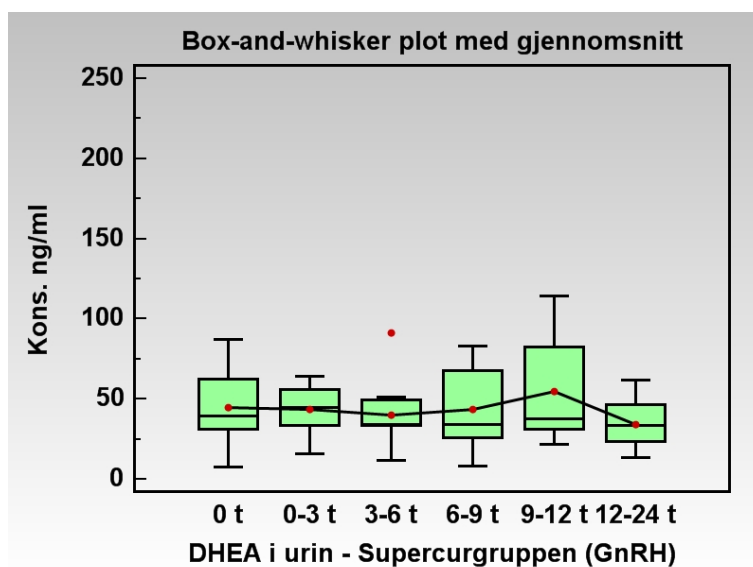
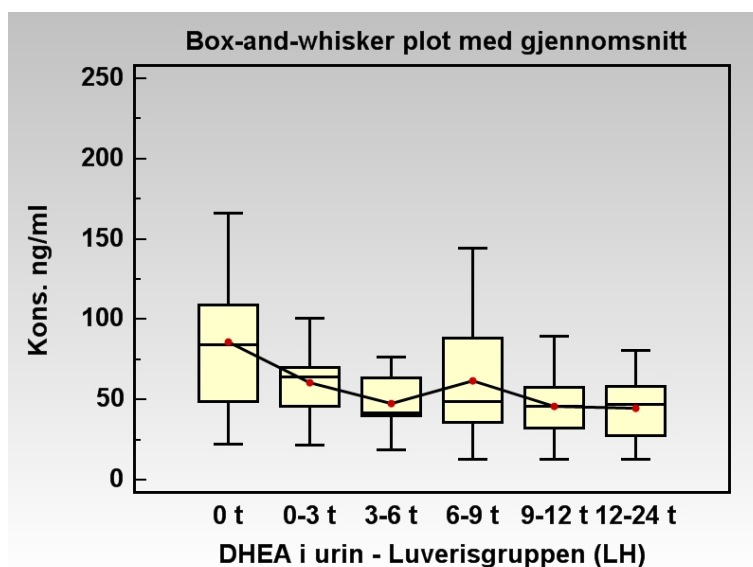


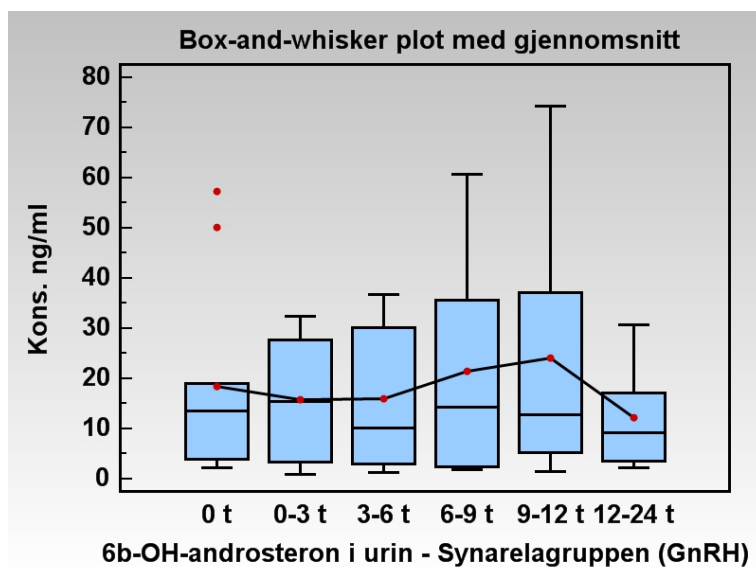
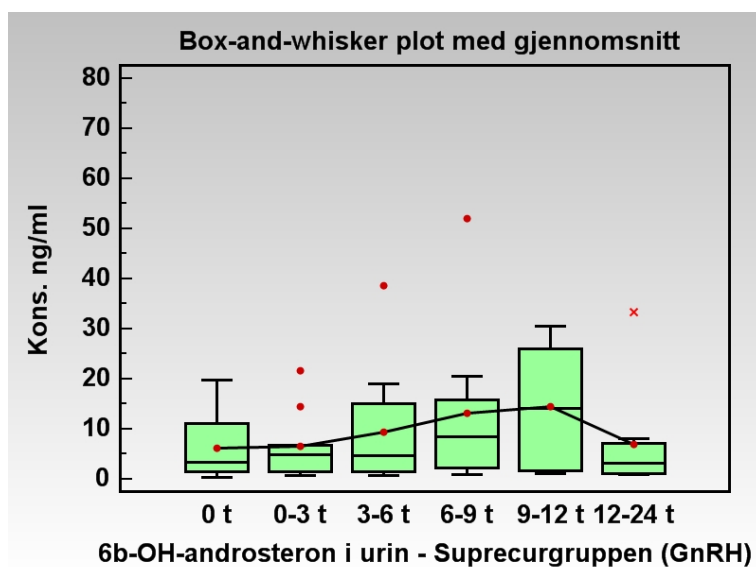
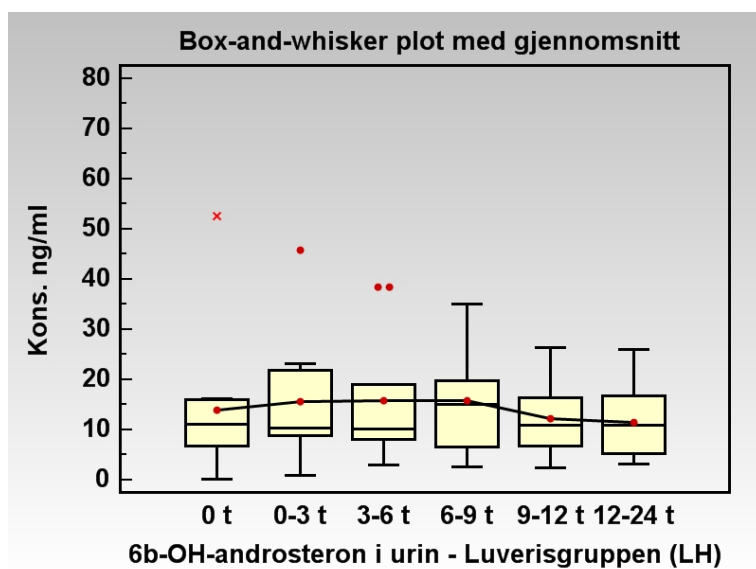


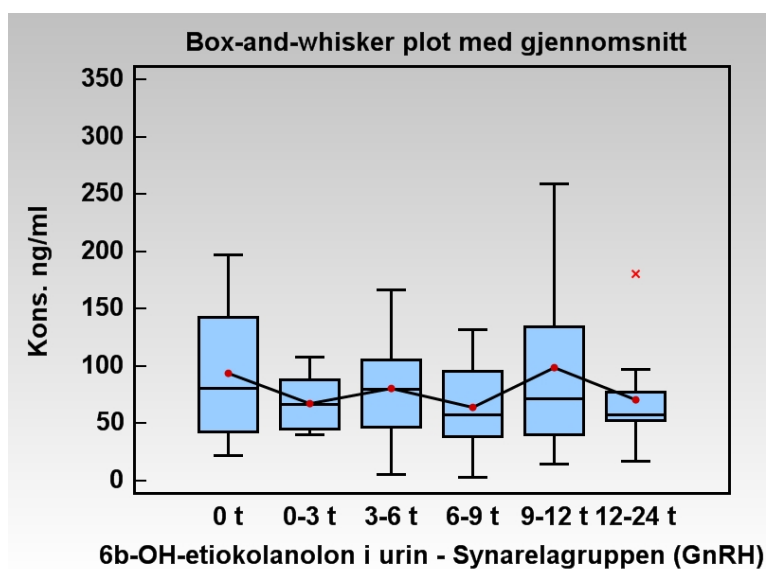
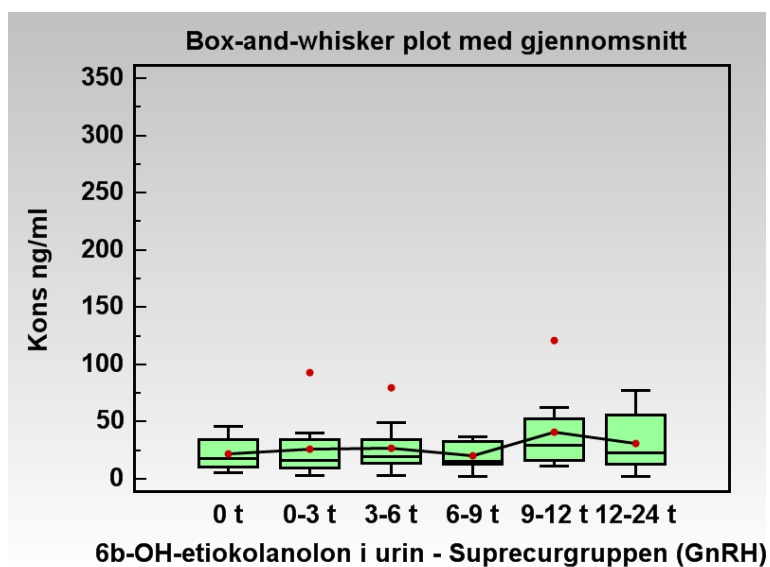
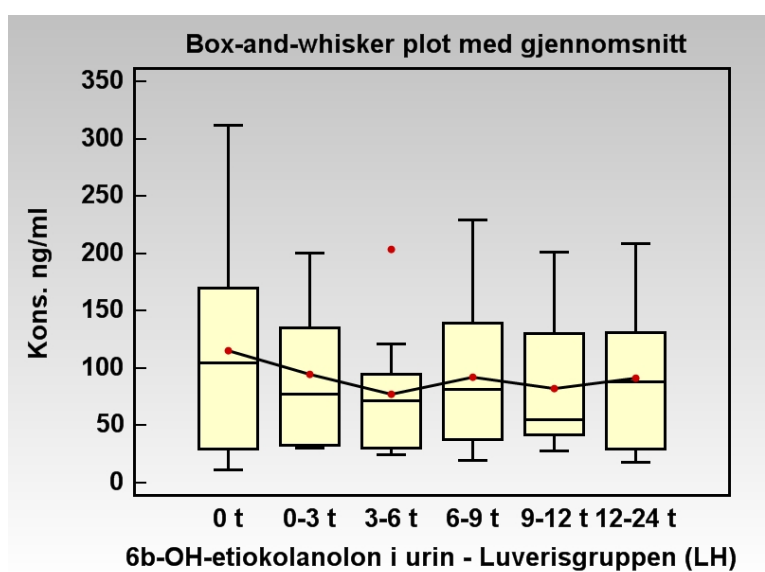
## 3.4.5 Etiokolanolon



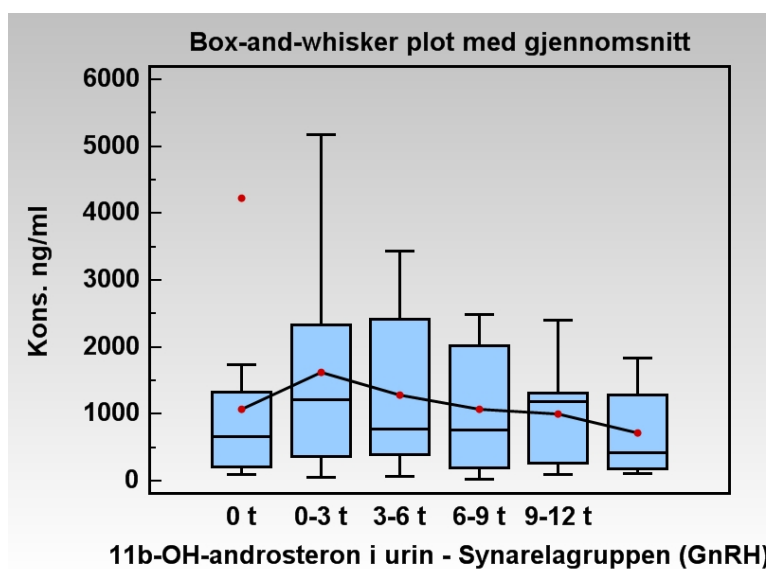
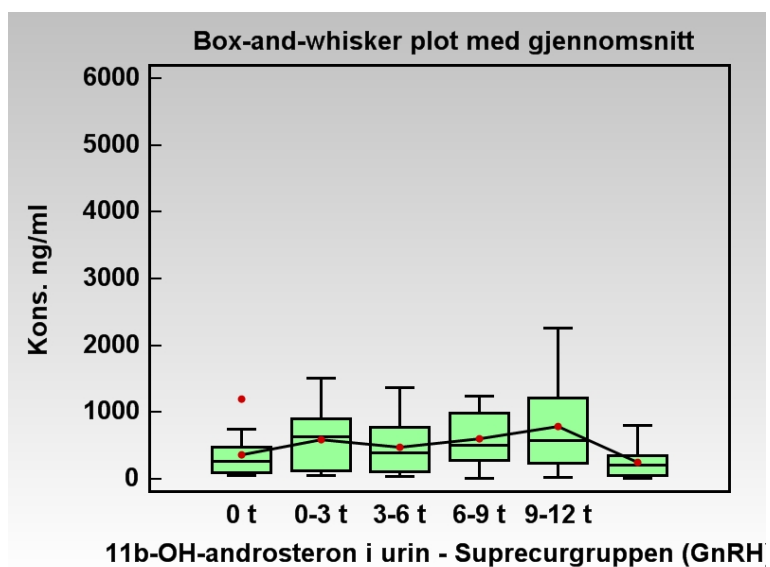
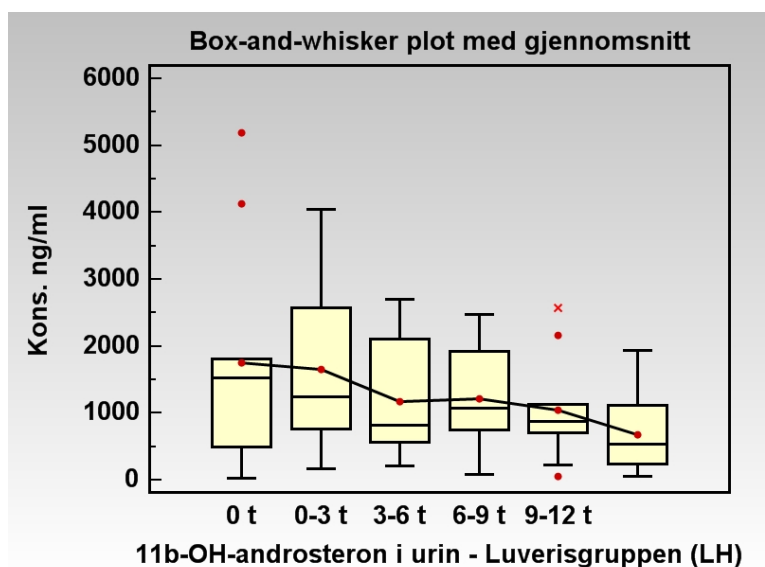
## 3.4.6 DHEA

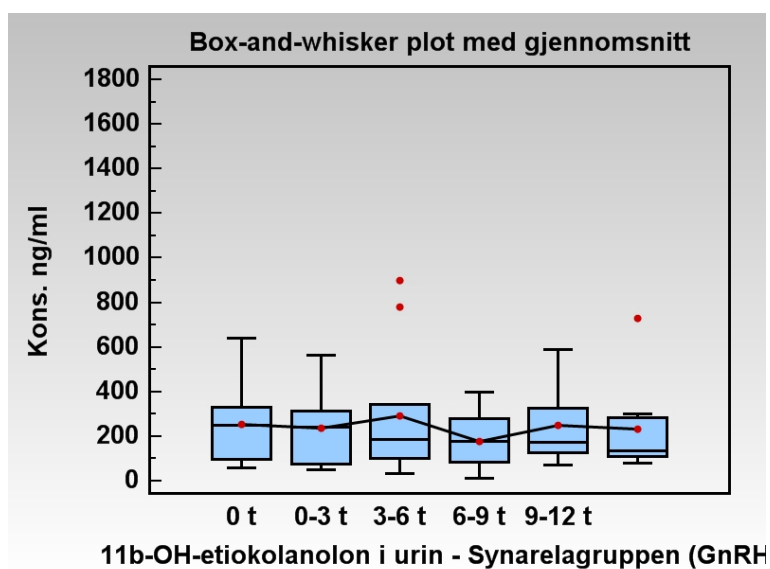
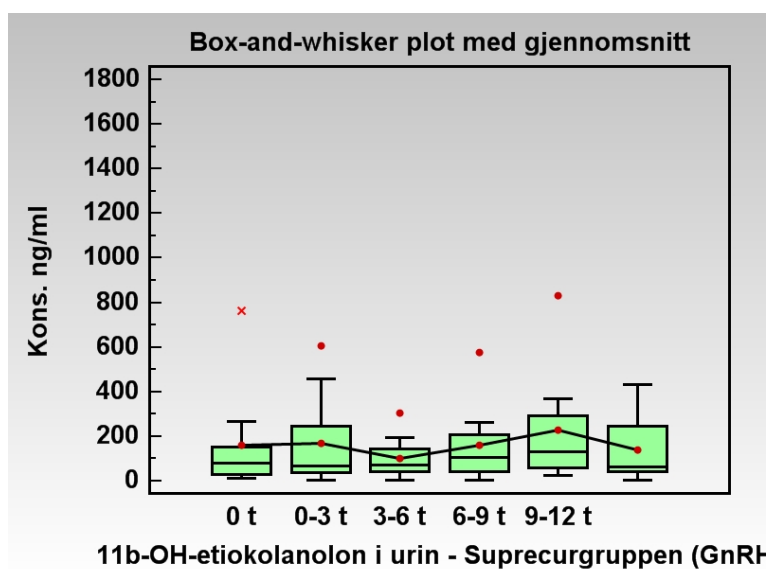
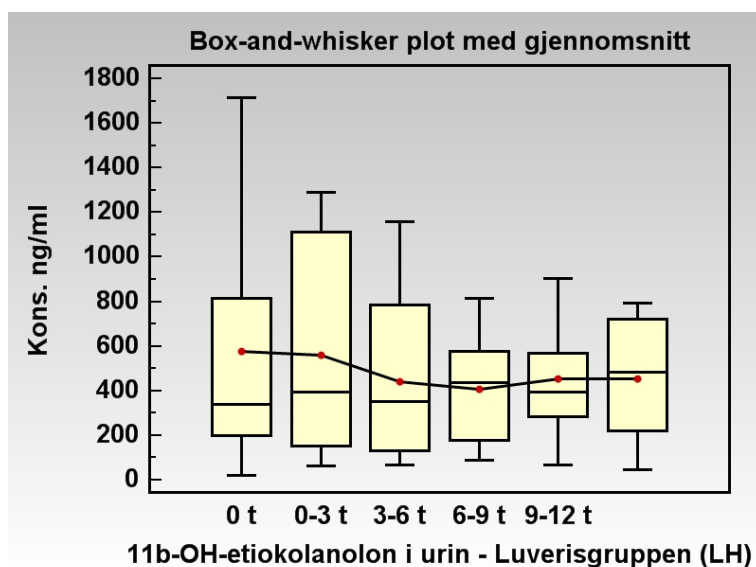


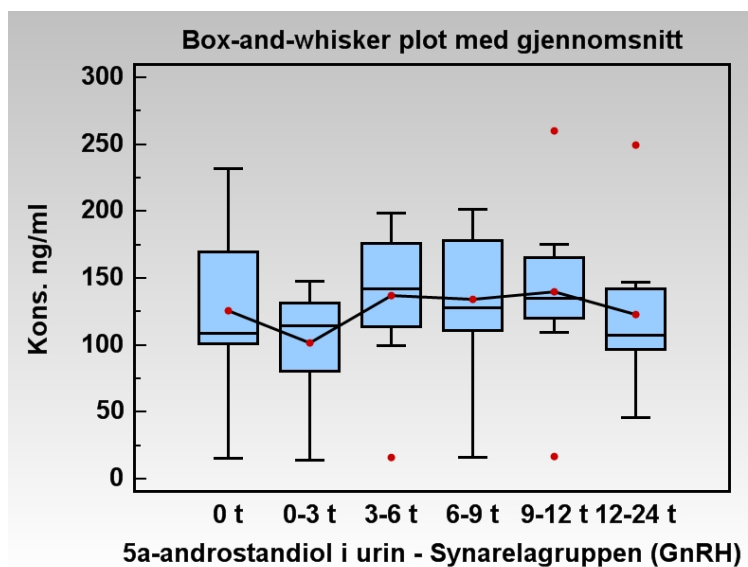
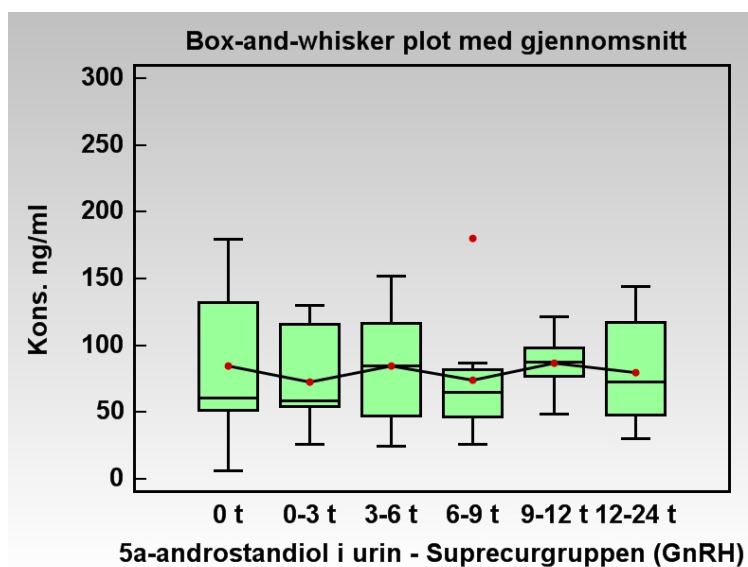
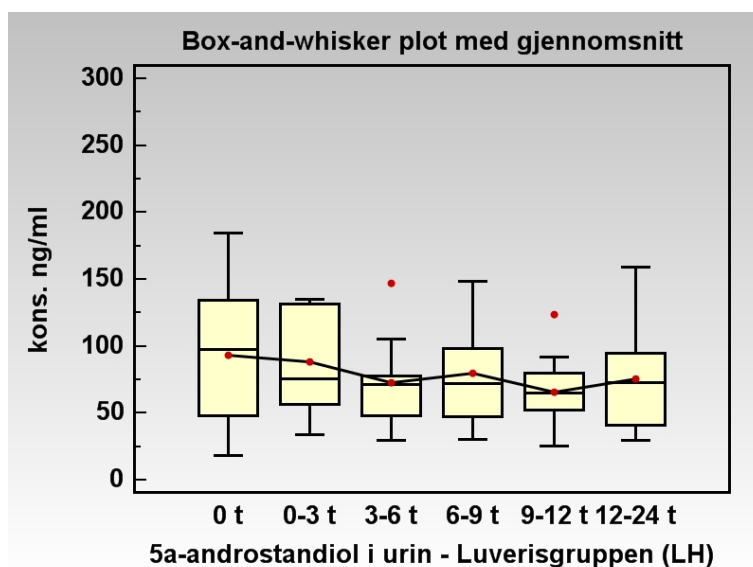
3.4.7 6 $\beta$ -OH-androsteron

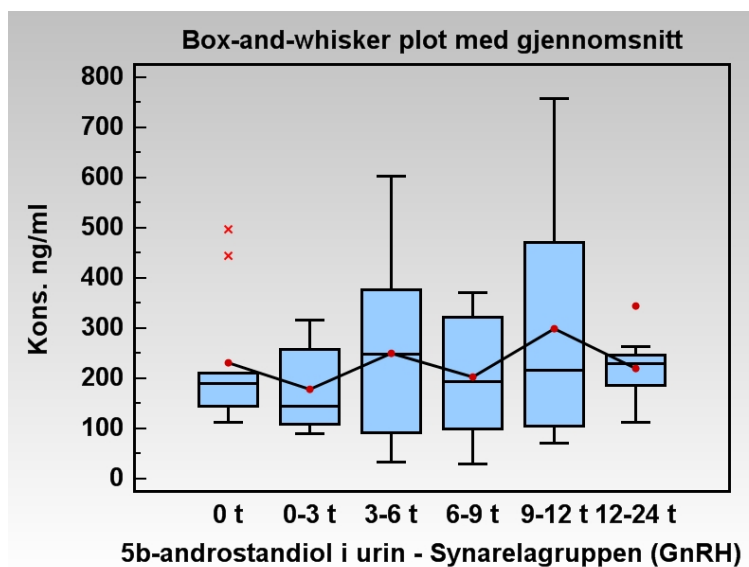
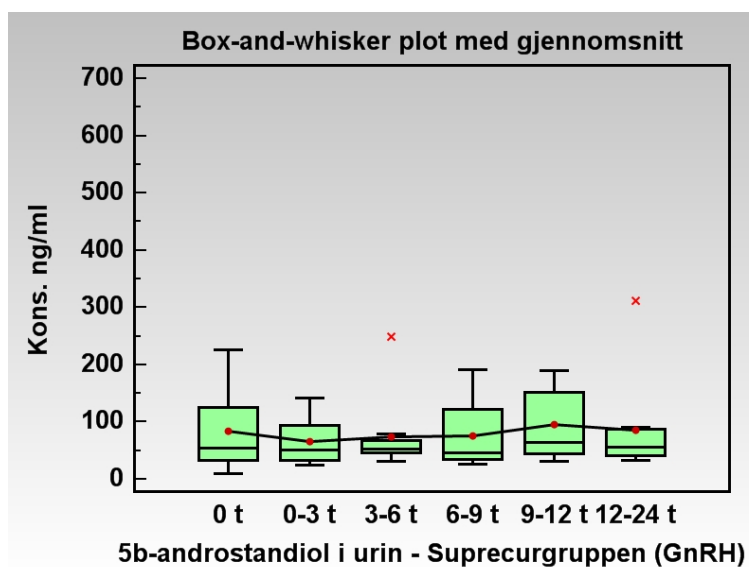
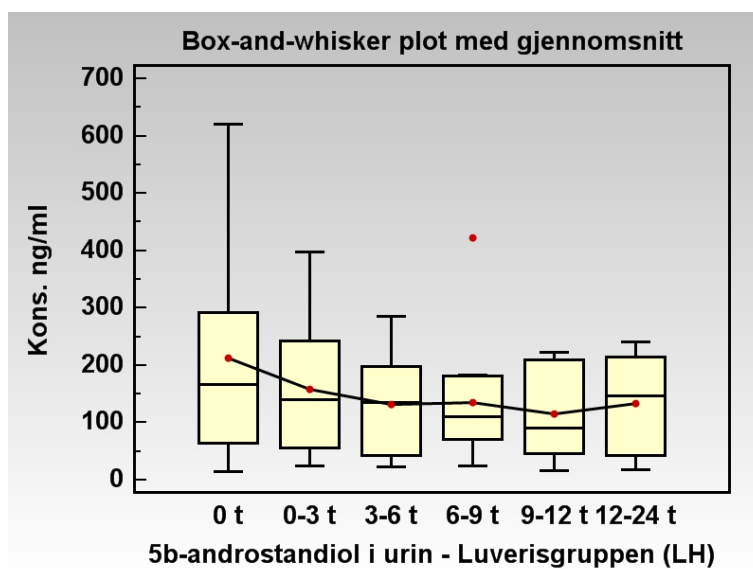
3.4.8 6 $\beta$ -OH-etikolanolon

### 3.4.9 11 $\beta$ -OH-androsteron



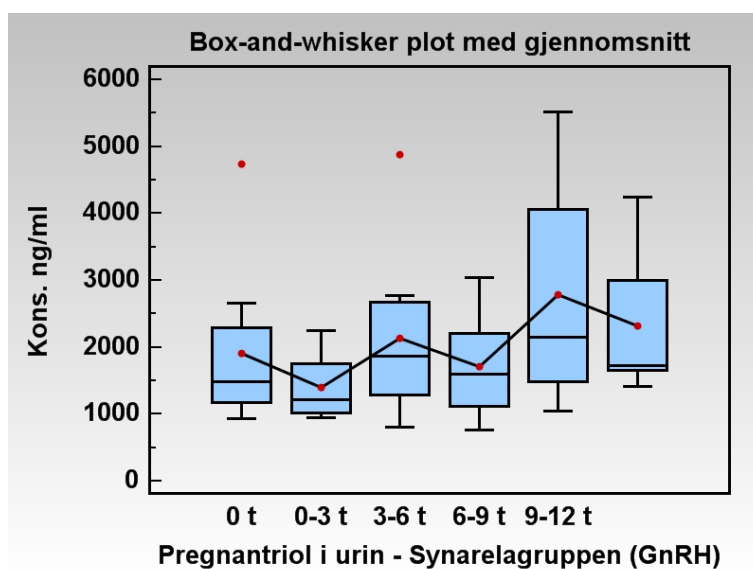
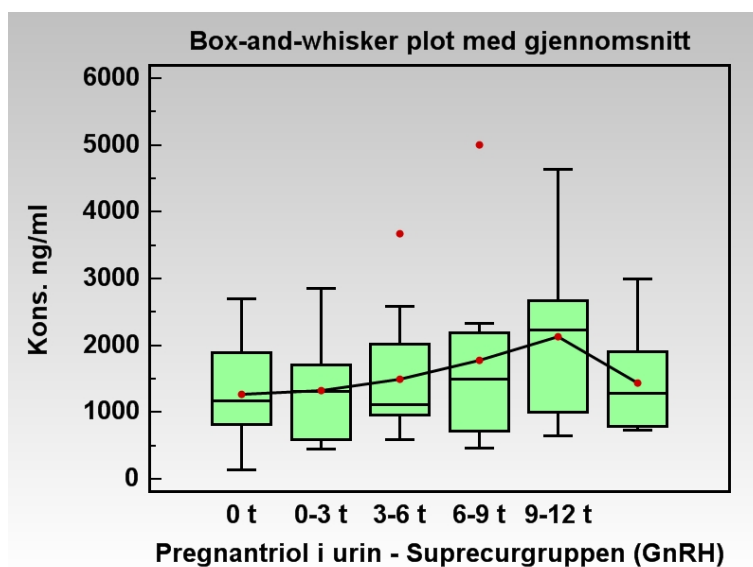
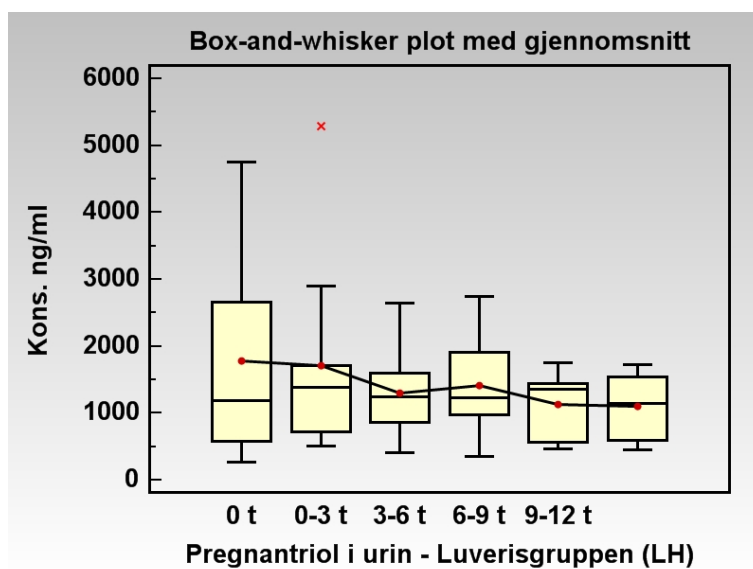
3.4.10 11 $\beta$ -OH-etikolanolon

3.4.11 5 $\alpha$ -androstandiol

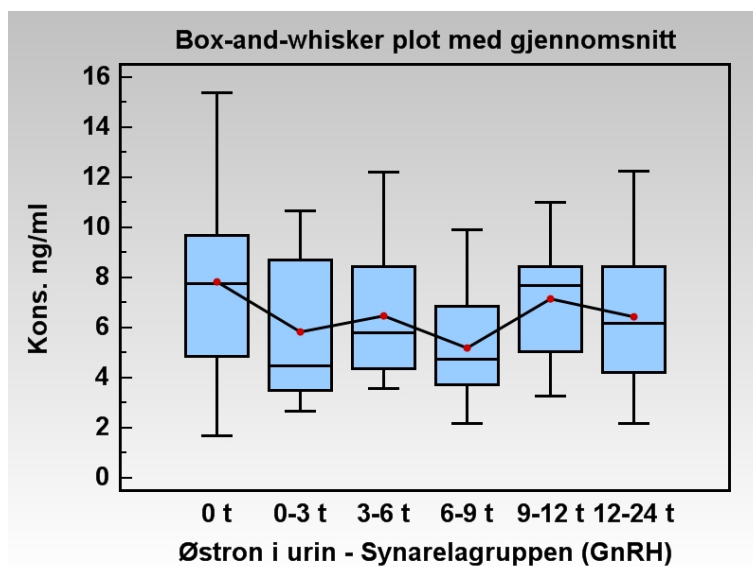
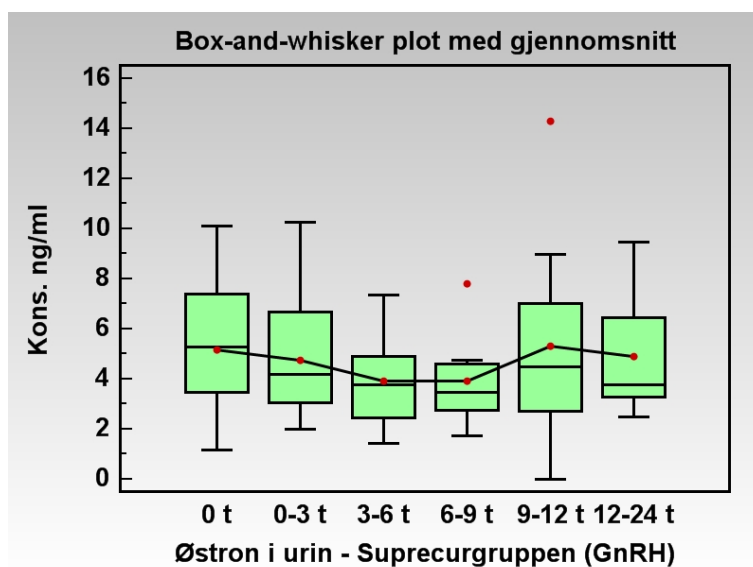
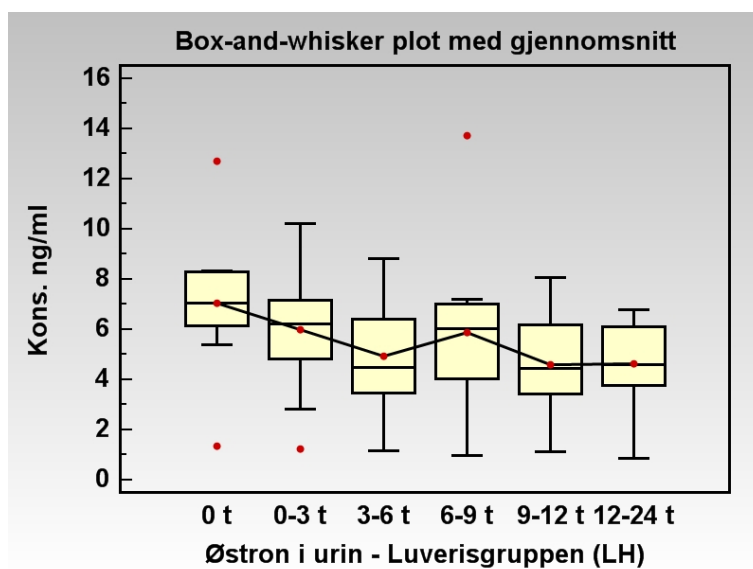
3.4.12 5 $\beta$ -androstandiol



## 3.4.13 Pregnantriol



## 3.4.14 Østron



## 4 DISKUSJON

### 4.1 Validering

En generell tendens i alle valideringsdataene er at de stoffene som ikke har en egen deuterert intern standard har dårligere presisjon, nøyaktighet og regresjonskoeffisient. Dette viser hvor stor innvirkning en god intern standard har på resultatene. Grunnen til at ikke alle stoffene har fått sin egen deutererte intern standard er at det var vanskelig eller ikke mulig å få tak i. Det er i de tilfellene valgt en intern standard som har lignende kjemiske egenskaper og en retensjonstid nær analytten.

#### 4.1.1 Presisjon og nøyaktighet

Kravet til presisjon og nøyaktighet er i henhold til GTFCh satt til 15 %, men ved LOQ kan man akseptere 20 %. Resultatene er vist i Tabell 19.

Alle stoffene med egen deuterert intern standard ligger godt innenfor kravene satt i GTFCh, foruten om 5 $\alpha$ -androstandiol. Nøyaktigheten for dette stoffet er 67,70 % ved den laveste konsentrasjonen 10 ng/ml. Presisjonen er likevel god, men verdiene ligger altså høyere enn den ”sanne” verdi. Det har vært vanskelig å finne en forklaring på dette, men noe av det kan muligens forklares ved at standardkurven er presset igjennom origo for å unngå negative verdier. Standardkurven til 5 $\alpha$ -androstandiol ville ikke dannet en kurve gjennom origo, men skjære y-aksen over origo. Det betyr at ved å presse kurven igjennom origo vil den ligge noe lavere enn punktene i nedre konsentrasjonsområde. Dette medfører at konsentrasjonen man leser av kurven kan være noe høyere enn den ”sanne” verdi. En annen forklaring er at vi muligens har en interferens som relativt sett vil påvirke verdiene i de lave konsentrasjonsområdene mer enn i det høye. Dette bør undersøkes nærmere for å utelukke tilfeldige feil.

Ved Seksjon for dopinganalyse er kravene ikke satt så strengt ved screeninganalyser. Her er presisjon- og nøyaktighetskravet satt til henholdsvis 30 % og 25 %. Verdiene til de stoffene uten egen deuterert intern standard ligger generelt høyere enn for de som har egen deuterert intern standard. Likevel ligger de alle fleste stoffene innenfor disse kravene. Her skiller imidlertid pregnandiol og pregnantriol seg ut, uten at det finnes noen åpenbar grunn til dette. Både pregnantriol og pregnandiol har dårlig nøyaktighet og høye verdier for intermediær

presisjon (*"precision of laboratory"*). Analyse metoden er dårligst tilpasset pregnanene, disse har en lengre sidekjede i C-17 og innehar dermed litt andre egenskaper i fordelingen mellom lipofilt og hydrofilt løsningsmiddel i prøveopparbeidelsen. Dette kan muligens forklare den store variasjonen vi ser for pregnanverdiene.

Det er normalt større variasjon i det lave området, dette sees også i denne studien for de aller fleste stoffene. Generelt ligger den intermediære presisjonen (*"precision of laboratory"*) noe høyere en repeterbarheten (*"random error within the day"*). Se Tabell 19. Dette kan forklares med at når en prøve opparbeides på forskjellige dager øker sannsynligheten for at tilfeldige feil skal oppstå.

#### **4.1.2 LOD og LOQ**

Ved beregning av analytiske grenser i VALISTAT version 1, ble både LOD og LOQ meget høye, dette skyldes at kravene til linearitet, standard avvik, gjennomsnitt og andre parametre i formlene er meget strenge (formler se Figur 17 og 18). Homogenitet er en essensiell faktor i utregningen av analytiske grenser i henhold til DIN 32645. Testen skal bevise at det laveste og høyeste konsentrasjonsnivået har statistisk sammenlignbare standard avvik. Det var ingen av stoffene som passerte homogenitetstesten og dette er med på å gjøre beregninger av analytiske grenser i henhold til DIN 32645 uegnet for denne studien.

Ved screeninganalyser aksepteres noe mer variasjon og kravene er ikke like strenge. Det ble derfor bestemt at LOD og LOQ skulle bestemmes etter prinsippet som normalt sett brukes ved Seksjon for dopinganalyse for screeninganalyser. Resultatene, beregnet etter følgende formler, er vist i Tabell 20.

$$\text{LOD} = \text{SD} * 3$$

$$\text{LOQ} = \text{SD} * 10$$

SD = Standard avviket for den laveste konsentrasjonen (tilsvarer nivå 1 i kalibratorkurven)

For stoffene med egen deuterert intern standard ligger LOQ under det laveste punktet på kurven. For disse er det mulig å kvantifisere stoffene i hele kalibreringsområdet etter de kriterier som er satt for LOQ i denne valideringen. LOQ kan også bestemmes ut fra signal/støy forhold. Dersom vi ser nærmere på kromatogrammene for de stoffene som ikke har egen deuterert intern standard ser vi at signal/støy forholdet er bedre enn 10:1. De stoffene

som innfrir kravet om et signal/støy forhold bedre en 10:1 vil få en LOQ under minste verdi for kurven.

LOD ligger, for alle stoffene, godt under laveste punkt på kurven.

#### **4.1.3 Linearitet**

Linearitetstesten i VALISTAT version 1 viste seg å være meget avansert. Dette skyldtes at VALISTAT krever at alle regresjonslinjene skal være homogene. Homogenitetstesten skal bevise at det laveste og høyeste konsentrasjonsnivået har statistisk sammenlignbare standard avvik (SD). Årsaken til at mitt tallmaterialet ikke passerer testen er at det er for stor forskjell i SD mellom laveste og høyeste konsentrasjon. I tillegg til homogenitetstesten opererer VALISTAT version 1 også med en Mandel-test for linearitet. Denne skal vise at kvadratisk regresjon ikke er signifikant bedre en lineær regresjon. Hvis regresjonskoeffisienten er nær 1,0 for både for kvadratisk- og lineærregresjon, kan veldig små forskjeller i dataene resultere i at kvadratisk regresjon kan være signifikant bedre. Resultatene for de ulike analyttene var en blanding av lineær og kvadratisk selv om regresjonskoeffisienten i de fleste tilfellene var > 0,985.

På grunnlag av de avanserte målemetodene i VALISTAT version 1, ble det bestemt at lineariteten skulle vurderes ut i fra den oppnådde regresjonskoeffisienten, uavhengig av homogenitet og Mandel-testen.

Regresjonskoeffisienten til standardkurver ved Seksjon for dopinganalyse må være større enn 0,985 for at kravet til linearitet skal kunne godkjennes (screeninganalyser). Resultatene er vist i Tabell 21.

Seks av stoffene oppfyller kravet, og det er alle stoffer med egen deuterert standard. De resterende åtte stoffene har oppnådd regresjonskoeffisient som i gjennomsnitt per stoff ligger mellom 0,971 og 0,983. Den laveste enkeltverdien er 0,892 og ble oppnådd for 11 $\beta$ -OH-etikolanolon dag 4. For de andre stoffene er det stort sett en eller to dårlige regresjonskoeffisienter som trekker gjennomsnittet ned under 0,985.

For å unngå negative verdier ble alle standardkurvene tvunget gjennom origo, og den oppnådde regresjonskoeffisienten tar hensyn til dette.

Årsaken til en lav regresjonskoeffisient er at kurven ikke er lineær over hele måleområdet. Det betyr at relativ respons ikke er proporsjonal med konsentrasjon.

For å kunne bruke denne metoden til kvantitative analyser bør det gjøres mer arbeid rundt de stoffene som ikke har deuterert standard. Det beste ville være deutererte intern standarder til alle stoffene, men dette er ikke tilgjengelig. En tendens i denne studien er at kurven bøyer litt av ved de høye konsentrasjonene, ved å krympe måleområdet kan muligens en bedre regresjonskoeffisient oppnås.

#### **4.1.4 Gjenvinning**

Gjenvinning bør ligge i området mellom 80-100 %. For screeningmetoder som omfatter flere ulike stoffer, kan lavere gjenvinning godkjennes fordi metoden ikke vil være optimal for alle analyttene. I denne studien er gjenvinning målt for to ulike konsentrasjoner for hvert stoff i henhold til krav i GTFCh. Resultatene er vist i Tabell 22.

Gjenvinningen i denne studien ligger mellom 86,49 - 109,77 %. Noen av stoffene har en gjenvinning på over 100 %. Forklaringen kan ligge i variasjonen (standard avviket) og/eller i gjennomføringen av gjenvinningsforsøket. Gjenvinning beregnes ved å sammenlikne responsarealer i en prøve der standardløsning og intern standard er tilsatt før prøveopparbeidelse, med responsarealer i en prøve der standardløsning og intern standard er tilsatt etter prøveopparbeidelse, men før derivatisering (før punkt 22 i flytskjema på side 50). Ved tilsetning, før derivatisering, kan noe av standardløsningen ikke ha kommet i kontakt med derivatiseringsreagenset, grunnet små volum. Dette kan resultere i at standarden ikke lenger representerer 100 %, men egentlig en lavere prosentandel. Når arealet fra prøven så sammenlignes med arealet i standarden vil prøven oppnå en høyere gjenvinning enn det som er rett.

Det ble diskutert om standard og intern standard løsningene skulle skylles ned med metanol, og så dampes inn, før tilsetning av derivatiseringsreagens. I valideringsrutinene ved Seksjon for dopinganalyse blir dette imidlertid ikke utført, og det ble bestemt at nedskylling ikke var nødvendig.

Man skulle tro at gjenvinning for pregnandiol og pregnantriol skulle ligge noe lavere enn de andre stoffene, på grunn deres noe lengre sidekjede i C-17. Denne sidekjeden endrer (som

nevnt tidligere) pregnanenes egenskaper i fordelingen mellom lipofilt og hydrofilt løsningsmiddel i prøveopparbeidelsen. Gjenvinningen for pregnanene er riktignok blant de laveste, men den er fortsatt mer en godkjent. Vi ser tilsvarende gjenvinning for noen av de andre stoffene blant annet 6 $\beta$ -OH-androsteron, 6 $\beta$ -OH-etiokolanolon og DHEA, men da spesielt for den laveste konsentrasjonen. Gjenvinning for pregnantriol utmerker seg noe ved at den er 108,35 % for 2 ng/ml og 80,71 % for 140 ng/ml. Bias for nøyaktighet (Tabell 20) for pregnantriol ved 2 ng/ml er så høy som 46,68, så det kan se ut til at responsen er unormalt høy, eller at vi har en interferens som relativt sett påvirker mer i de lave konsentrasjonsområdene.

#### **4.1.5 Forsøket**

En av feilkildene ved utskillelsesforsøk er hvorvidt forsøkspersonene følger de angitte retningslinjene. I denne studien hadde hver enkelt person ansvar for at utskillelsesforsøket ble utført etter de angitte instruksjonene. I et utskillelsesforsøk må all urin samles i hvert tidsintervall.

Mikrobiell degradering av prøven vil kunne påvirke konsentrasjonen av steroider. For å kontrollere at prøvene ikke hadde gjennomgått en slik degradering, ble androstandion vurdert kvantitativt for alle prøvene. Forhøyede verdier av androstandion er en indikasjon på nedbryting. [17] Dette kan forhindres ved å oppbevare prøvene kjølig inntil de blir analysert. Urinprøvene ble oppbevart i fryse- eller kjølerom på Seksjon på dopinganalyse, men det foreligger ikke opplysninger om hvordan forsøkspersonene faktisk har oppbevart sin urin, selv om det ble opplyst at det skulle oppbevares kaldt. Ingen av prøvene som ble analysert viste imidlertid forhøyede androstandionverdier.

Det foreligger ingen opplysninger om forsøkspersonene inntok andre legemidler under utskillelsesforsøket.

Alle målte verdier for stoffene ble korrigert for spesifikk vekt, dette for å få resultater som er mest mulig sammenlignbare. Det er ikke vanlig å gjøre det i screeninganalyser i dopingsammenheng.

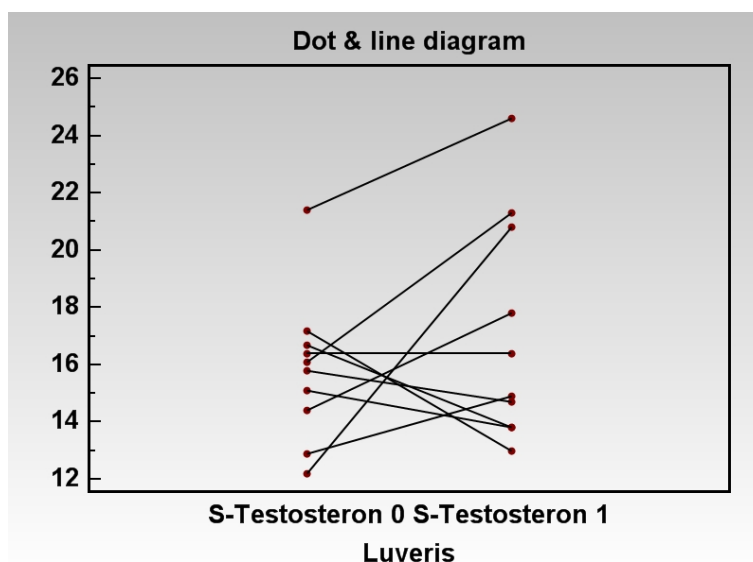
#### 4.1.6 Blodprøvene

Det ble valgt å se etter signifikante forskjeller mellom blodprøveresultatene fra dag 1 og dag 2 innenfor hvert stoff. De tre legemidlene hadde noe ulikt resultat, der LH injeksjon var tydelig forskjellig fra de to GnRH administreringene.

#### Luverisgruppen (rekombinant LH)

Det ble ikke sett noen signifikante endringer i denne gruppen. Det betyr at den forskjellen som eventuelt finnes mellom dag 1 og dag 2 ikke med sikkerhet kan forklares av en injeksjon med rekombinant LH. Dette er noe uventet da det ble antatt at en LH-injeksjon skulle ha direkte påvirkning på testosteron produksjonen.

For testosteron er gjennomsnittet økt fra 15,82 til 17,11, men med en  $p = 0,3265$  kan vi ikke med sikkerhet si at økningen skyldes administrering av rekombinant LH. Medianen i de to gruppene er nesten like, henholdsvis 15,95 og 15,65. En av grunnene til at p-verdien blir såpass stor er at variansen i gruppen etter administrering av rekombinant LH er stor. Dersom vi ser på endring av testosteronkonsentrasjon i serum per person får vi et litt mer detaljert bilde. Se Figur 19.

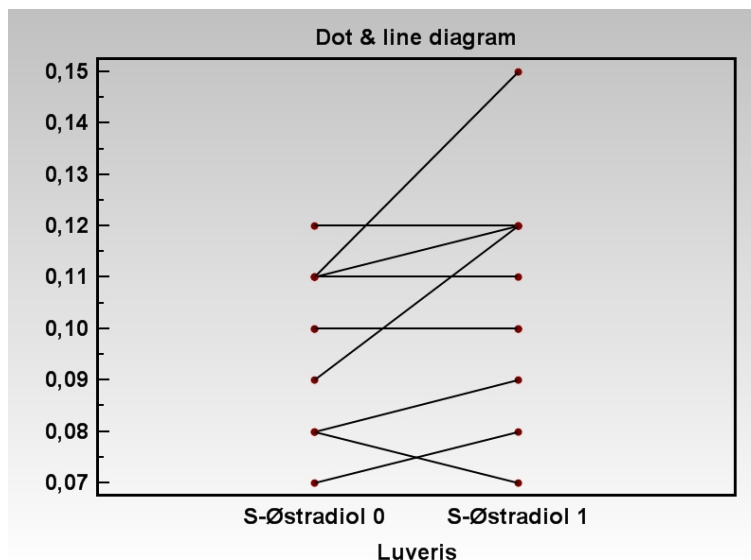


Figur 19 - Dot & line diagram for testosteron i Luverisgruppen

Vi ser en økning hos 5 personer, mens de resterende 5 har en nedgang av testosteron 24 timer etter administrering.



Det stoffet som har en p-verdi nærmest kravet på 0,05 er østradiol med  $p = 0,0947$ . Østradiol er en metabolitt av testosteron og økte østradiolnivåer kan være et resultat av at S-testosteron har vært forbigående høyt, men at dette ikke detekteres 24 timer etter administrasjon. Dot & line diagrammet (Figur 20) for østradiol viser tydelig at 5 av 9 personer har en økning etter 24 timer.



Figur 20 - Dot & line diagram for østradiol i Luverisgruppen

Med en p-verdien på 0,0947 kan vi ikke med sikkerhet si at de individuelle økningene av østradiol skyldes administrering av rekombinant LH

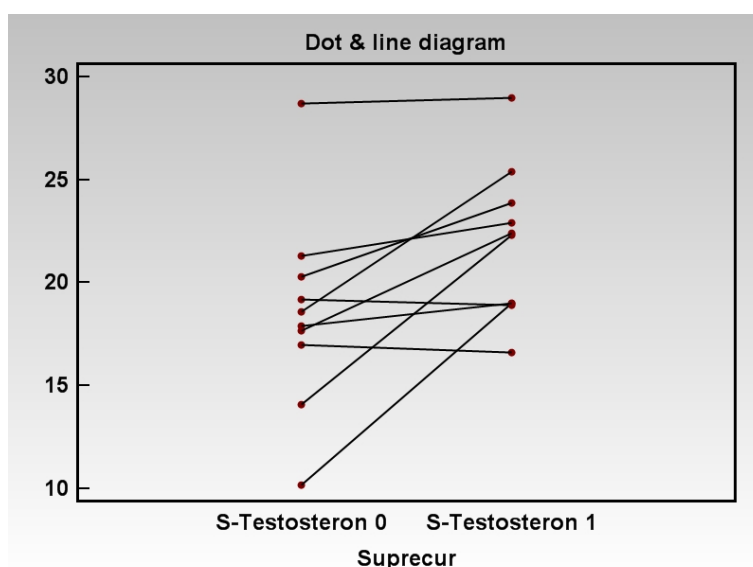
De andre tre stoffene som er målt i serum viser svært liten endring fra dag 1 til dag 2.

Det er mulig at tidspunktet for blodprøvene (24 timers intervall) ikke er optimalt for å kunne se signifikante økninger ved en LH-injeksjon. Det kan være at resultatene hadde vist mer dersom blodprøvene hadde blitt tatt hyppigere og eventuelt over en lengre periode. Den individuelle reaksjonen på en LH-injeksjon kan også være med på å skape et noe diffust bilde.

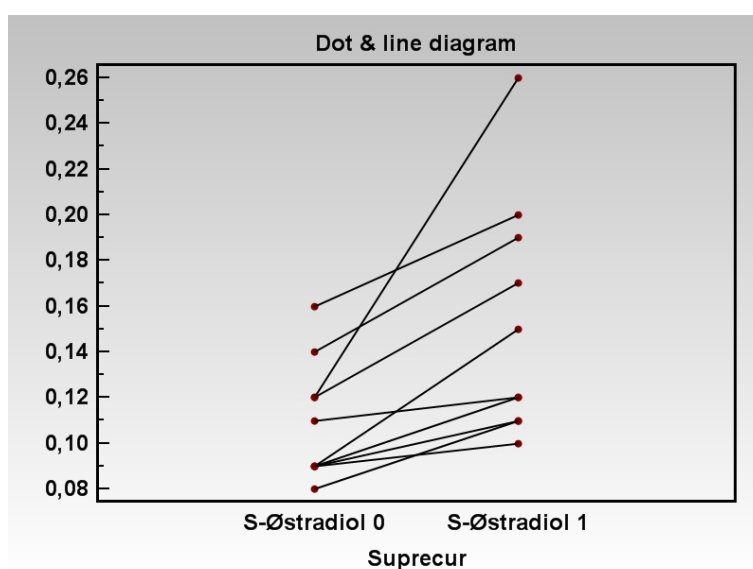
### Suprecurgruppen (Buserelin, GnRH-analog)

For denne gruppen ble det funnet signifikante endringer for S-testosteron og S-østradiol, med p-verdier på henholdsvis 0,0273 og 0,0050. Både testosteron- og østradiolkonsentrasjonen har økt etter administrering av Suprecur.

Hvis vi ser på dot & line diagrammer for disse stoffene ser man at 8 av 10 personer har en økning i s-testosteron og 10 av 10 personer har en økning i s-østradiol. Se Figur 21 og 22.



Figur 21 - Dot & line diagram for testosteron i Suprecurgruppen



Figur 22 - Dot & line diagram for østradiol i Suprecurgruppen

På grunnlag av p-verdier  $< 0,05$  kan man statistisk sett si at endringen skyldes administrering av Suprecur. Det er imidlertid viktig å presisere at de økte nivåene fortsatt er innenfor normalområdet, og etter dagens lovverk, prøvetaking- og analyserutiner ville ingen av disse personene kunne blitt dømt for misbruk av GnRH-analoger. Dersom steroidprofiler blir videreutviklet og tatt i bruk i fremtiden, kan det være at disse resultatene kan være med på å sette søkelyset på misbruk GnRH-analoger. Ved bruk av steroidprofiler vil man oppnå at hver

enkelt idrettutøver får sine spesifikke normalverdier. En plutselig økning av testosteron og østradiol kan da muligens forklares med administrering av en GnRH-analog, eller også andre stoffer som øker den androgene produksjonen.

### **Synarelagruppen (Naferalin, GnRH-analog)**

I denne gruppen ble det funnet signifikante endringer for S-testosteron ( $p = 0,0378$ ), S-østradiol ( $p=0,0014$ ) og S-FSH ( $p=0,0173$ ). Alle tre stoffene har økt. Det er litt uventet at S-FSH har en signifikant økning i denne gruppen, men ikke i Suprecurgruppen. Begge preparater er GnRH-analoger og skal ha samme effekt på utskillelse av både LH og FSH. Suprecur og Synarela inneholder imidlertid to ulike GnRH analoger, henholdsvis Buserelin og Naferalin. Funnet kan derfor forklares ved at effekten av de to GnRH-analogene kan inntre på forskjellig tidspunkt.

### **Felles for GnRH-analogene**

Det er å forvente at konsentrasjonen av LH øker etter administrering av GnRH-analoger. Økningen som sees er imidlertid ikke signifikante. En signifikant økning kan likevel ha vært tilstede, men på et tidligere tidspunkt enn 24 timer etter administrering.

#### **4.1.7 Urinprøver**

Det ble på et tidlig tidspunkt diskutert om vi trengte en kontrollgruppe der forsøkspersonene avga blodprøver og samlet urin uten å få administrert noe preparat. På grunn av kostnader og studiens tidsbegrensning ble ikke dette satt i verk. Det ble tenkt at forsøkspersonene kunne være sin egen kontroll ved at de avga en urinprøve før administrering av legemiddelet (nullprøve). Nullprøven skulle sammenliknes med urinprøvene som ble samlet inn i løpet av et døgn. På grunn av stor variasjon innenfor hver gruppe og individuell døgnvariasjon ble dette vanskelig. Det ble derfor bestemt å flytte fokuset fra hva som var normale verdier og eventuelle endringer fra disse, til å se på forskjellen mellom de tre ulike gruppene. I de tilfellene der det eventuelt ble sett endringer fra det ”normale” er dette beskrevet spesielt.

### **LH i urin**

LH administrering i form av Lutropin alfa vil antakelig ikke påvirke mengden av LH i urin. Dette skyldes at  $< 5 \%$  av dosen utskilles i urin. [33] Administrasjon av Lutropin alfa vil imidlertid på sikt kunne påvirke den endogene produksjonen av LH ved hjelp av en negativ feedback mekanisme. Studien går ikke over lang nok tid til å kunne vise dette.

Konsentrasjonsendringene som sees i de ulike tidsintervallene etter administrering av Luveris tilsvarer antakelig den normale pulsatile sekresjonen. En signifikant nedgang i LH sees fra 0 til 0-3 timer, noe som gjenspeiler den normale døgnvariasjonen. LH sekresjon er større om natten, enn om morgenen. [57] Resultatene for LH i urin etter administrering av GnRH-analoger viser to grafer ulike fra den oppnådd med Luveris injeksjon. For Suprecurgruppen ser vi en signifikant økning av LH i urin fra 0 til 3-6 timer, denne økningen ble ikke sett i Luverisgruppen. Det samme gjelder for Synarelgruppen, men her sees den signifikante økningen allerede mellom 0 og 0-3 timer.

Det faktum at det normalt sees en nedgang i LH om morgenen, men her sees en økning av LH i urin i GnRH-gruppene, kan tyde på at administrering av GnRH analoger slik som Buserelin og Nafarelin vil øke konsentrasjonen av LH i urin.

### **Generelt for testosteron og testosteron relaterte steroider.**

Det er få eller ingen signifikante endringer mellom de tre gruppene eller tidsintervallene for testosteron eller testosteron relaterte steroider i urin. I noen tilfeller kan det sees en liten, ikke signifikant, endring av gjennomsnitt, men i de fleste tilfeller følger det da også med et større standard avvik. I disse tilfellene er det noen enkeltverdier som trekker gjennomsnittet opp. Nedenfor følger en noe mer detaljer beskrivelse av utvalgte stoffer.

### **Testosteron**

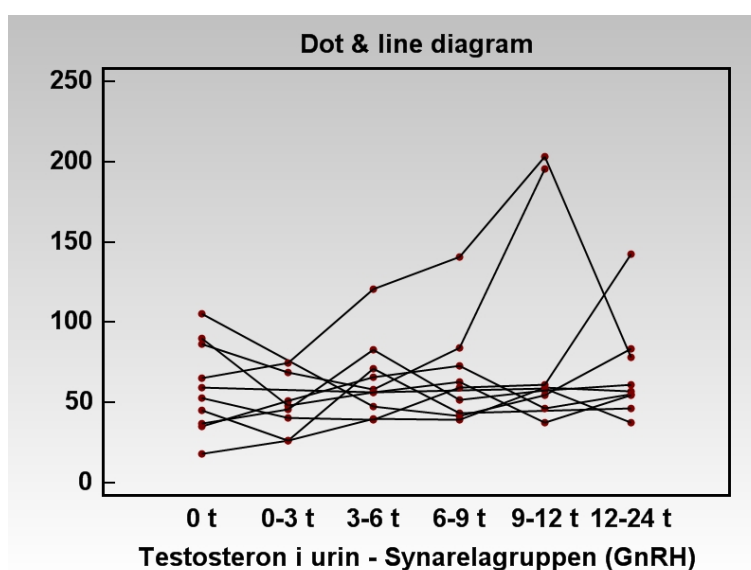
Resultatene for testosteron viser ingen signifikante forskjeller mellom de 3 gruppene og heller ingen signifikante endringer mellom tidsintervallene. Tabell 26 viser gjennomsnitt, median og SD for luverisgruppen.

**Tabell 26 - Sentrale statistiske tall for testosteron Luverisgruppen**

	<b>0 t</b>	<b>0-3 t</b>	<b>3-6 t</b>	<b>6-9 t</b>	<b>9-12 t</b>	<b>12-24 t</b>
Gjennomsnitt	59,65	47,92	64,01	66,42	86,13	68,59
Median	56,21	47,18	57,46	59,76	58,73	57,00
SD	27,68	17,45	24,15	31,68	64,68	31,25

Her ser vi at medianen endres svært lite, mens gjennomsnittet drifter noe mer. Det er tydelig å se at det største SD finner vi i gruppen 9-12 timer, her sees også det høyeste gjennomsnittet, mens medianen er ganske lik som i de andre gruppene. Det er i denne gruppen vi finner den høyeste testosteronverdien på 203,23 ng/ml. WADA anbefaler at en prøve som inneholder

mer enn 200 ng/ml testosteron bør undersøkes videre med IRMS. [17] Hos denne personen, samt hos en person til, sees det en økning av testosteron etter 9-12 timer. Figur 23 viser Dot & line diagram for de 10 personene i Synarelagruppen. Det er tydelig at disse to personene skiller seg ut fra de resterende. En tredje person utmerker seg også, ved at testosteron nivået plutselig øker 12-24 timer etter administrering. Det kan derfor se ut til at 2-3 personer har fått et økt testosteronnivå etter administrering av Synarela, men vi finner ingen signifikant endring for gruppen. De observerte endringene kan like gjerne skyldes tilfeldigheter og individuell døgnvariasjon.



Figur 23 - Dot & line for testosteron i Synarelagruppen

I følge litteraturen kunne kan det forventes en økning av testosteron etter administrering av rekombinant-LH eller GnRH-analoger. Årsakene til at denne studien ikke klarer å detektere endringen kan være flere:

- Enkeltdosering av legemidlene kan ha vært for lave
- Legemidlene kan ha blitt gitt for få ganger, eller over for kort tid
- Effekten av legemidlet kan komme etter at siste prøve er tatt av forsøkspersonen
- En eventuell endring av konsentrasjon kan skjules av individuelle døgnvariasjoner
- Det er vanskelig å detektere endring siden studien ikke omfatter en kontrollgruppe

Flere studier konkluderer med at testosteronnivåer er høyest om morgen og synker utover dagen. Grafene for testosteron i denne studien har ingen signifikant nedgang. Kan dette være et uttrykk for at testosteron produksjonen likevel blir påvirket av administrering av LH og

GnRH? Men at dette uttrykkes ved at nivåene er stabile fra morgen til kveld og ikke synker slik vi kunne forvente? [58] Her skulle vi gjerne hatt en kontrollgruppe.

### **Androsteron og Etiokolanolon**

For androsteron og etiokolanolon sees det en svak ikke signifikant nedgang fra 0 timer til 24 timer for luverisgruppene. Denne nedgangen er ikke tilstede i GnRH-gruppene. For Synarela gruppen sees også noe høyere verdier av androsteron over hele perioden enn for de to andre gruppene.

Kan det være slik at endogent LH trigget av GnRH-analoger har større biologisk effekt enn rekombinant LH? Kan det være slik at den svake nedgangen av androsteron vi ser i luverisgruppen skyldes normal døgnvariasjon, men at denne ikke inntreffer under effekt av GnRH-analoger? Eller kan det også være slik at en negativ feedback mekanisme allerede er satt i gang etter administrering av rekombinant LH?

Det er vanskelig å svare på de ovenstående spørsmålene uten å kunne sammenlikne resultatene med en kontroll gruppe.

### **6 $\beta$ -OH-androstandiol**

6 $\beta$ -OH-androstandiol nivåene er noe høyere i Synarelagruppen i forhold til Suprecur- og Luverisgruppen. Dette kan skyldes rene tilfeldigheter, men det kan også ha en sammenheng med at androsteron som er en forløper til 6 $\beta$ -OH-androstandiol også var noe høyere i Synarelagruppen. Ved en nærmere titt på dataene ser det ut til at det er de samme personene som løfter gjennomsnittet for androsteron og for 6 $\beta$ -OH-androstandiol.

Vi ser at medianen holder seg på omtrent samme nivå, mens gjennomsnittet flytter seg oppover som følge av at noen verdier øker.

### **6 $\beta$ -OH-etikolanolon og 11 $\beta$ -OH-etikolanolon**

Det er forskjeller i konsentrasjon i de tre gruppene både for 6 $\beta$ -OH-etikolanolon og 11 $\beta$ -OH-etikolanolon. Suprecurgruppen skiller seg ut som lav for 6 $\beta$ -OH-etikolanolon, mens både Suprecur og Synarela ligger lavt for 11 $\beta$ -OH-etikolanolon. Det virker ikke å være noen god forklaring på dette, men vi ser at nivåene er lave også før administrering av GnRH-analog. SD, gjennomsnitt og median forandrer seg lite i løpet av døgnet. Det er noe påfallende at

Luverisgruppen for  $11\beta$ -OH-etikolanolon ligger såpass mye over de to andre gruppene. Det kan tenkes at det her er forskjell i respons på rekombinant LH og GnRH-analoger, men på den annen side ser vi at det er stor spredning og høye nivåer av  $11\beta$ -OH-etikolanolon i Luverisgruppen allerede før administrering.

### **Østron**

Østron er en metabolitt av østradiol. Etter å ha funnet signifikante endringer av østradiol i serum, kunne vi forvente å se endringer av østron i urin. I serum er det signifikant økning av østradiol i GnRH-gruppene, men vi ser ingen signifikant forskjell for disse gruppene i urin.

## 5 KONKLUSJON

Gonadotropiner, som luteiniserende hormon (LH), folikkelstimulerende hormon (FSH) eller gonadotropinfrisettende hormoner (GnRH) foreligger som genteknologisk fremstilte preparater og er forbudt å bruke for menn i henhold til WADAs dopingliste. I denne studien ble Luveris (rekombinant LH), Suprecur (GnRH) og Synarela (GnRH) gitt til 30 menn i alderen 18-37 år.

Det ble benyttet allerede etablerte metoder ved Hormonlaboratoriet og Seksjon for dopinganalyse til analyse av parametre som LH- og testosteronrelaterte steroider, men validering av metodikken i forbindelse med kvantifisering ble gjennomført.

Valideringen ble utført i henhold til retningslinjer gitt ved Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) ved bruk av VALISTAT.exe version 1. Denne valideringsmetoden er ikke egnet for screeninganalyser da kravene til analytiske grenser og linearitet er satt alt for strengt. Den nåværende valideringsmetoden ved Seksjon for dopinganalyse er lettere å bruke og gir god nok informasjon om metodens egnethet.

Ved validering av metoden sees det klart bedre linearitet, presisjon og nøyaktighet for de stoffene som hadde sin egen deutererte standard. For de andre stoffene ville det vært hensiktsmessig å finne en bedre egnet intern standard.

Ved analyse av blodprøvene så vi signifikante endringer av testosteron, LH og østradiol for de forsøkspersonene som fikk GnRH-analoger.

Ved analyse av urinprøvene var det få eller ingen endringer å spore. De forskjellene som sees er ikke signifikante og kan like gjerne kan skyldes tilfeldigheter som administrering av LH eller GnRH-analoger. Et unntak er LH i urin, der det er tydelig forskjell mellom inntak av LH og GnRH-analoger. I ettertid har det vist seg at det kunne vært gunstig med en kontrollgruppe.

Selv om vi i denne studien ikke har funnet signifikante endringer i urin kan det likevel ikke utelukkes at administrering av LH og GnRH-analoger øker den androgene produksjonen. Her trengs det mer forskning. Det første som burde gjøres er å innføre en kontrollgruppe, samt å



se på frekvensen og lengden av prøvetaking. Dosering av legemidlene bør også vurderes, både styrken av en enkeltdose og varighet av behandlingen.

Studien avdekket signifikante endringer av S-testosteron, S-LH og S-østradiol for de forsøkspersonene som fikk GnRH-analoger. Men konsentrasjonsnivåene er innenfor normalområde og resultatene kan trolig ikke brukes i dopingsammenheng.

I denne studien er det ikke detektert noen signifikante biomarkører i urin for å kunne avsløre misbruk av LH eller GnRH-analoger. Det kan skyldes at studiedesignet ikke var godt nok eller at disse medikamentene ikke har noe særlig potensialet som dopingmidler.

## REFERANSER

1. Noakes, T.D., *Tainted Glory - Doping and Athletic Performance*. 2004. s. 847-849
2. Haug, E., Hemmersbach, P., Birkeland, K. *Glimt fra idrettens dopinghistorie*. Tidsskrift for Norsk Lægeforening 1999. 17(199), s.2538-2540.
3. Haug, E., Birkeland K.I., Hemmersbach, P. *Doping og idrettsutøver*. Medicinsk årbog 2000. Munkegård, København. s. 9-18.
4. [www.antidoping.no](http://www.antidoping.no) *Dopingens historie*. [cited 13.11.2007].
5. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) *The 2007 Prohibited list International standard*. 2006 [cited 13.11.2007].
6. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) *World Anti-Doping Code*. 2003 [cited 13.11.2007].
7. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen K.E., *Kapittel 28 i Legemiddelanalyse*. 2004. Fagbokforlaget, Bergen.
8. Demers, L.M. and R.J. Whitley, *Function of the adrenal cortex*, Tietz *Textbook of Clinical Chemistry*, C.A. Burtis and E.R. Ashwood, Editors. 1999, W.B. Saunders company, Philadelphia.
9. [http://www.aus.no/modules/module\\_123/proxy.asp?D=2&C=368&I=3111](http://www.aus.no/modules/module_123/proxy.asp?D=2&C=368&I=3111) Kap 5: Fysiologi – Patofysiologi – Diagnostikk [cited 3.12.2007].
10. *The nomenclature of steroids*, Eur J. Biochem. 1989. 186 s. 429-458
11. <http://tigger.uic.edu/~dbhale/immune-endocrine.htm> [cited 24.04.2007]
12. Snyder, Peter J, *3 Endocrinology, II Testes and Testicular Disorders*, ACP Medicine Online, Dale DC; Federman DD, Eds. WebMD Inc., New York, 2000. <http://www.acpmedicine.com/> [cited 14.11.2007]
13. DeGroot, L. J. et al. *Endocrinology*, forth edition, W.B. Saunders Company, 2001. s. 2124-2125
14. Kerkhof, D.v.d., *Part I: Steroid profiling and the T/E ratio, Steroid profiling in doping analysis*. 2001. Febodruk BV.
15. Shackleton, C.H.L., et al., *Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas Chromatography isotope ratio mass spectrometry*. Steroids, 1997. 62(10) s. 665-673.
16. Aguilera, R., Hatton, C. K., Catlin, D. H. *Detection of Epitestosterone Doping by Isotope Ratio Mass Spectrometry*, Clinical Chemistry 48:4, 2002. s. 629–636
17. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). *WADA Technical Document - TD2004EAAS, Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids*. 2004 [cited 07.12.2007].
18. Saudan, C., et al., *Testosterone and doping control*. 2006. s. 121-24.

19. Llewellyn, W., *Andractim (dihydrotestosterone)*, Anabolics 2006
20. Gronowski, A.m. and M. Landau-Levine, *Reproductive endocrine function*, Tietz *Textbook of Clinical Chemistry*, C.A. Burtis and E.R. Ashwood, Editors. 1999. W.B. Saunders company, Philadelphia.
21. Van Eenoo, P. and FT. Delbeke, *Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control-New steroids and new insights*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006.101(4-5), s. 161-178.
22. Kicman, AT. and D. Gower, *Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives* Annals of Clinical Biochemistry, 2003. 40(4), s. 321-356.
23. Homma, K., et al., *Elevated Urine Pregnanetriolone Definitively Establishes the Diagnosis of Classical 21-Hydroxylase Deficiency in Term and Preterm Neonates*. 2004. s. 6087-6091.
24. <http://www.uus.no/brukerhandbok/index.asp?bok=2&Kap=9&unit=541&par=298&boknavn=> [cited 07.12.2007]
25. <http://www.uus.no/brukerhandbok/index.asp?Bok=2&Kap=9&Par=300&Boknavn=> [cited 07.12.2007]
26. <http://www.uus.no/brukerhandbok/index.asp?bok=2&Kap=9&unit=499&par=200&boknavn=> [cited 07.12.2007]
27. Aarskog, D., Bjerknes R., *Den neuro-hypofysære-gonadale akse og hypogonadotrop hypogonadisme* Pediatrisk Endokrinologi 2005;19, s. 61-69
28. <http://www.uus.no/brukerhandbok/index.asp?Bok=2&Kap=9&Par=146&Boknavn=> [cited 07.12.2007]
29. [www.legemiddelhandboka.no](http://www.legemiddelhandboka.no) [cited 07.12.2007]
30. <http://www.legemiddelverket.no/spc/Godkjente/Synarela-SPC%2018.10.06.doc> [cited 07.12.2007]
31. <http://www.antidoping.no/t2.asp?p=61017> [cited 07.12.2007]
32. [www.felleskatalogen.no](http://www.felleskatalogen.no) [cited 07.12.2007]
33. [http://www.legemiddelverket.no/spc/Godkjente/NO\\_Luveris\\_010726.doc](http://www.legemiddelverket.no/spc/Godkjente/NO_Luveris_010726.doc) [cited 07.12.2007]
34. <http://www.legemiddelverket.no/spc/Godkjente/Suprecur%202000-08-30.doc> [cited 07.12.2007]
35. Spigset, O., Slørdal, L., *Grunnlegende farmakokinetikk – eliminasjon*, Tidsskrift for Norsk Lægeforening nr. 9, 2005; 125, p 1181-1182.
36. Schanzer, W., *Metabolism of anabolic androgenic steroids*. Clinical Chemistry 1996, 42, 7, s. 1001-1020.

- 
37. Mi, Y., Shapiro, S. D., Baenziger, J. U. *Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO<sub>4</sub> receptor is critical for implantation in vivo*. Journal of Clinical Investigation 2002, 109 s. 269–276.
  38. Krishnamurthy, H. et al. *Postendocytotic Trafficking of the Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-FSH Receptor Complex*. Molecular Endocrinology 2003, 17(11), s. 2162-2176
  39. Chan, R.L., et al. *Absorption and metabolism of nafarelin, a potent agonist of gonadotropin-releasing hormone* Clin Pharmacol Ther. 1988 Sep, 44(3), s. 275-82.
  40. Kiesel, L., et al. *Serum concentration and urinary excretion of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist buserelin in patients with endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab. 1989 Jun, 68(6) s. 1167-73.
  41. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 21, Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget, Bergen.
  42. Greibrokk, T., E. Lundanes, and K.E. Rasmussen, *Kapittel 16, Kromatografi*. 1998, Univerisitetsforlaget, Oslo.
  43. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 18, Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget, Bergen.
  44. Nordli, H.R., *Bestemmelse av endogene steroider i urin*. 1994, Hormonlaboratoriet: Oslo.
  45. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 23, Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget, Bergen.
  46. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 22, Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget, Bergen.
  47. Greibrokk, T., E. Lundanes, and K.E. Rasmussen, *Kapittel 8 Gasskromatografi, Kromatografi*. 1998, Univerisitetsforlaget, Oslo.
  48. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 17, Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget, Bergen.
  49. Trout, G.J. and R. Kazlauskas, *Sports drug testing - an analyst's perspective*. Chemical Society Reviews, 2003.
  50. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 20, Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget, Bergen.
  51. Weykamp, C.W., *Steroid Profile for Urine: Reference Values*. Clinical Chemistry, 1989. 35(12), s. 2281-2284.
  52. Burtis, C.A. and E.R. Ashwood, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Vol. 3. 1999, Philadelphia, W. B. Saunders Company.
  53. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). *WADA Technical document - TD2003IDCR - Identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry*. 2003 [cited 07.12.2007]
-

54. [www.ich.org](http://www.ich.org) *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. Q2 (R1) 2005.
55. Schmitt, G., Herbold, M., Peters, F. *Validation of Methods in the Forensic-Toxicological Laboratory*. Arvecon GmbH, 2003
56. Rasmussen, K., *Bioanalyse og validering av analysemetoder*, Farmasøytisk Institutt, UiO 2005, s. 20-30.
57. Spratt, D. et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH, and testosterone. *Am J Physiol* 1988. 254: s. 658–66.
58. Nankin, H.R. et al. *Daytime titers of testosterone, LH, estrone, estradiol, and testosterone-binding protein: acute effects of LH and LH-releasing hormone in men*. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1975. Aug, 41(2) s. 271-81